

DIE PAULY-REAKTION:  
VERBESSERUNG DER STABILITÄT  
VON AZOHISTIDINVERBINDUNGEN  
UND MODIFIZIERUNG ESSENTIELLER AMINOSÄURESEITENKETTEN  
DER sn-GLYZERIN-3-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE

ANDREAS HOFMANN

Disbui. München

1987



Aus dem Institut für Physiologische Chemie,  
Physikalische Biochemie und Zellbiologie  
der Universität München

Vorstand

Prof.Dr.rer.nat. Martin Klingenberg  
Prof.Dr.rer.nat. Hans Georg Zachau  
Prof.Dr.rer.nat. Dr.med. Walter Neupert  
Prof.Dr.med. Volker Herzog

**DIE PAULY-REAKTION:  
VERBESSERUNG DER STABILITÄT  
VON AZOHISTIDINVERBINDUNGEN  
UND MODIFIZIERUNG ESSENTIELLER AMINOSÄURESEITENKETTEN  
DER sn-GLYZERIN-3-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
**Andreas Hofmann**

aus  
**München**

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. J. Otto

1. Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. Fateh-Moghadam

2. Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Rabes

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.1987

XXXXXXXXXX

Mein Vater, du bist derjenige, der mich zu dem Mann gemacht hat, den ich heute bin. Du hast mich gelehrt, die Welt zu sehen, wie sie ist, und nicht wie sie sein sollte. Du hast mich gelehrt, die Menschen zu verstehen, wie sie sind, und nicht wie sie sein sollten. Du hast mich gelehrt, die Dinge zu tun, die ich tun möchte, und nicht die Dinge, die ich tun sollte.

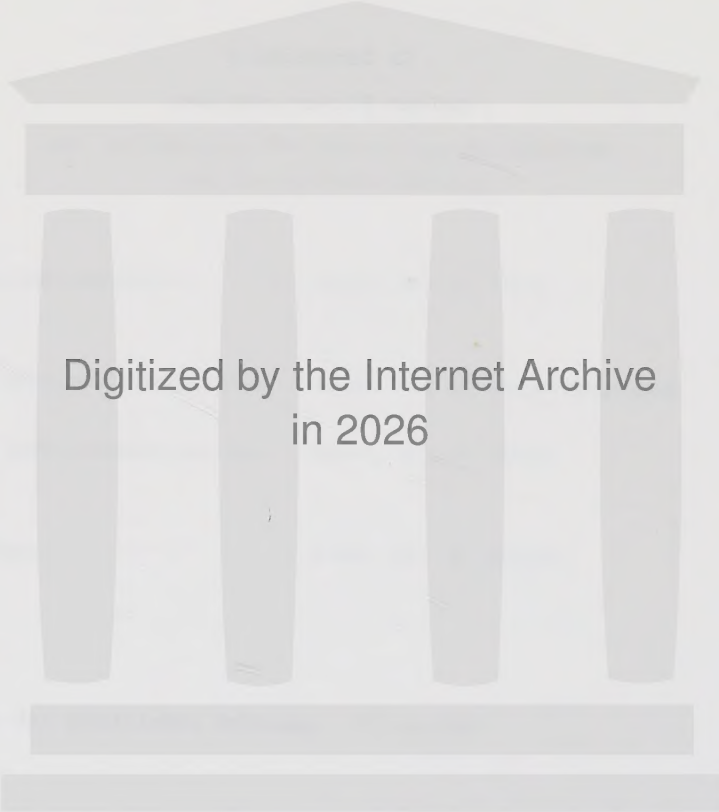
In Dankbarkeit  
meinen Eltern gewidmet

Mein Vater, du bist derjenige, der mich zu dem Mann gemacht hat, den ich heute bin. Du hast mich gelehrt, die Welt zu sehen, wie sie ist, und nicht wie sie sein sollte. Du hast mich gelehrt, die Menschen zu verstehen, wie sie sind, und nicht wie sie sein sollten. Du hast mich gelehrt, die Dinge zu tun, die ich tun möchte, und nicht die Dinge, die ich tun sollte.

Mein Vater, du bist derjenige, der mich zu dem Mann gemacht hat, den ich heute bin. Du hast mich gelehrt, die Welt zu sehen, wie sie ist, und nicht wie sie sein sollte. Du hast mich gelehrt, die Menschen zu verstehen, wie sie sind, und nicht wie sie sein sollten. Du hast mich gelehrt, die Dinge zu tun, die ich tun möchte, und nicht die Dinge, die ich tun sollte.

Mein Vater, du bist derjenige, der mich zu dem Mann gemacht hat, den ich heute bin. Du hast mich gelehrt, die Welt zu sehen, wie sie ist, und nicht wie sie sein sollte. Du hast mich gelehrt, die Menschen zu verstehen, wie sie sind, und nicht wie sie sein sollten. Du hast mich gelehrt, die Dinge zu tun, die ich tun möchte, und nicht die Dinge, die ich tun sollte.

Mein Vater, du bist derjenige, der mich zu dem Mann gemacht hat, den ich heute bin. Du hast mich gelehrt, die Welt zu sehen, wie sie ist, und nicht wie sie sein sollte. Du hast mich gelehrt, die Menschen zu verstehen, wie sie sind, und nicht wie sie sein sollten. Du hast mich gelehrt, die Dinge zu tun, die ich tun möchte, und nicht die Dinge, die ich tun sollte.



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

## D A N K S A G U N G

Herrn Prof. J. Otto danke ich für die Überlassung des Themas und ganz besonders dafür, daß ich die zahlreichen auftretenden Probleme jederzeit mit ihm diskutieren konnte. Sein Rat und sein Verständnis waren mir bei dieser Arbeit unentbehrlich.

Herrn Andreas Zucker, der seit zwei Jahren zu unserer Arbeitsgruppe gehört, möchte ich für die fruchtbaren Diskussionen und für seine Ratschläge danken, die mir besonders bei theoretischen und technischen Problemen im Labor eine große Hilfe waren.

Herrn Prof. E. Wachter danke ich für seinen Rat und seine Hilfe bei der Isolierung der Azoaminosäuremodellverbindungen und bei der Auftrennung der modifizierten GDH-Peptide durch die HPLC, die leider noch nicht zum Erfolg führten.

Gleichfalls danke ich den Herren Prof. G. Müllhofer und S. Werner, die mir ihre Spektralphotometer zur Messung der zahlreichen Spektren zur Verfügung stellten.

Herrn Prof. W. Machleidt und besonders Frau Gerda Behrens danke ich für die exakte, zuverlässige und schnelle Durchführung der Aminosäureanalysen sowie für ihre freundliche Hilfsbereitschaft bei allen Problemen.

Bei allen Professoren und Mitarbeitern des Institutes möchte ich mich ferner für die nette Atmosphäre und die bereitwillige Hilfe bei allen Schwierigkeiten bedanken. Darunter danke ich insbesondere Frl. Anita Gruber aus unserer Arbeitsgruppe für ihre Herzlichkeit und Hilfsbereitschaft bei allen Problemen, die bei der Laborarbeit auftraten.

Auch Herrn Dipl.Ing. Hofner und Herrn Bender sowie der ganzen Werkstatt möchte ich für die Hilfe bei der Behebung technischer Probleme besonders danken.

Ferner danke ich meinen Freunden Stefan Erbacher und Hans Murr, die mir ihre Textverarbeitungssysteme großzügig zur Verfügung gestellt haben. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht so leicht beendet worden.

## GLIEDERUNG

Seite

|           |                                                                                                                             |    |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <u>1.</u> | <u>Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen</u>                                                                              | 11 |
| <u>2.</u> | <u>Einleitung</u>                                                                                                           | 13 |
|           | Funktion der GDH                                                                                                            |    |
|           | Aktivitätszentren verschiedener                                                                                             |    |
|           | Dehydrogenasen                                                                                                              |    |
|           | Fragestellung dieser Arbeit                                                                                                 |    |
| <u>3.</u> | <u>Markierung von Histidinseitenketten</u><br><u>der GDH mit Diazoniumverbindungen:</u><br><u>Ergebnisse und Diskussion</u> | 21 |
| 3.1       | Methoden zur Modifizierung von Histidin<br>(Literaturübersicht)                                                             | 21 |
| 3.1.1     | <u>Übersicht über die verschiedenen Verfahren</u>                                                                           | 21 |
| 3.1.1.1   | Pauly-Reaktion                                                                                                              | 21 |
| 3.1.1.2   | Photooxidation                                                                                                              | 21 |
| 3.1.1.3   | Diäthylcarbonat                                                                                                             | 22 |
| 3.1.1.4   | Halogenierung                                                                                                               | 22 |
| 3.1.1.5   | Modifizierung mit 3-(2-Bromacetyl)-pyridin                                                                                  | 22 |
| 3.1.2     | <u>Eignung der verschiedenen Verfahren</u>                                                                                  | 24 |
| 3.1.2.1   | Besonderheiten bei der Markierung von<br>Proteinen mit 3-(2-Bromacetyl)-pyridin                                             | 24 |
| 3.1.2.2   | Nachteile bei der Verwendung von<br>3-(2-Bromacetyl)-pyridin                                                                | 25 |
| 3.1.2.3   | Vorteile der Pauly-Reaktion                                                                                                 | 26 |

|              |                                                                                   |    |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| <u>3.1.3</u> | <u>Nachweis von Histidin und Tyrosin<br/>mit Hilfe von Diazoniumverbindungen</u>  | 27 |
| 3.1.3.1      | Reaktionsablauf                                                                   | 28 |
| 3.1.3.2      | Zur Nomenklatur der entstehenden<br>Verbindungen                                  | 29 |
| 3.1.3.3      | Reaktionsprodukte                                                                 | 30 |
| 3.1.3.3.1    | Mono- und Bisazoverbindungen                                                      | 30 |
| 3.1.3.3.2    | Kupplung der Diazoniumverbindung an<br>verschiedenen Atomen des Imidazolringes    | 31 |
| 3.1.3.3.3    | Kupplung mit anderen Aminosäuren                                                  | 32 |
| 3.1.3.4      | Photometrische Bestimmung von Azoamino-<br>säureverbindungen                      | 33 |
| 3.1.3.4.1    | Absorptionsmaxima der Verbindungen                                                | 33 |
| 3.1.3.4.2    | Gegenseitige Überlappung der Spektren,<br>Instabilität der Kupplungsprodukte      | 34 |
| 3.1.3.4.3    | Verbesserte photometrische Bestimmungs-<br>methoden für Histidin                  | 34 |
| 3.1.3.5      | Mögliche Ursachen für die Instabilität<br>der Azohistidinverbindungen             | 36 |
| 3.1.3.5.1    | Kupplung mit Dediazonierungsprodukten                                             | 36 |
| 3.1.3.5.2    | Entstehung von Diazoaminoverbindungen                                             | 38 |
| 3.1.3.5.3    | Endprodukte ohne -N=N-C-Bindung<br>(Azogruppe)                                    | 39 |
| 3.1.3.6      | Bekannte Verfahren zur Stabilisierung von<br>Azohistidinverbindungen              | 40 |
| 3.1.3.7      | Die Diazokupplung mit N-Acetylhistidin:<br>Zusammenfassung der Literaturübersicht | 40 |
| 3.1.3.8      | Anforderungen an die in dieser Arbeit<br>einzusetzende Methode                    | 41 |

|              |                                                                            |           |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.2</b>   | <b>Modifizierung von Aminosäuremodell-</b><br><b>verbindungen</b>          | <b>43</b> |
| <u>3.2.1</u> | <u>Ziel der Versuche</u>                                                   | 43        |
| <u>3.2.2</u> | <u>Messung von Differenzspektren</u>                                       | 44        |
| <u>3.2.3</u> | <u>Modifizierung von Histidin mit</u><br><u>diazotierter Sulfanilsäure</u> | 46        |
| 3.2.3.1      | Spektrum von Diazobenzolsulfonsäure                                        | 46        |
| 3.2.3.2      | Kupplungsprodukte, Stabilitätsprobleme                                     | 47        |
| 3.2.3.3      | Verfahren nach Sluyterman                                                  | 49        |
| 3.2.3.4      | Variationsversuche und deren Ergebnisse                                    | 51        |
| 3.2.3.5      | Zusammenfassung der Versuche mit<br>diazotierter Sulfanilsäure             | 55        |
| <u>3.2.4</u> | <u>Kupplung von Aminosäuren mit diazotiertem</u><br><u>p-Nitroanilin</u>   | 57        |
| 3.2.4.1      | Kupplungsprodukte mit N-Acetylhistidin,<br>-tyrosin und -cystein           | 57        |
| 3.2.4.2      | Kupplung mit N-Acetylhistidin                                              | 58        |
| 3.2.4.2.1    | Verbesserung der Stabilität, Ergebnisse                                    | 58        |
| 3.2.4.2.2    | Einfluß der Kupplungszeit                                                  | 63        |
| 3.2.4.2.3    | Absolutspektren von Probe und Referenz                                     | 65        |
| 3.2.4.2.4    | Variation des Diazoniumsalz-Überschusses                                   | 67        |
| 3.2.4.2.5    | Einfluß der Diazoniumsalz-Konzentration                                    | 70        |
| 3.2.4.2.6    | Diskussion                                                                 | 72        |
| 3.2.4.3      | Kupplung mit N-Acetyltyrosin                                               | 79        |
| 3.2.4.3.1    | Stabilität der gemessenen Spektren                                         | 79        |
| 3.2.4.3.2    | Unterscheidung zwischen Mono- und<br>Bisazotyrosin                         | 81        |
| 3.2.4.3.3    | Zusammenfassung                                                            | 82        |

|              |                                                                                                       |           |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.4.4      | Kupplung mit N-Acetylcystein                                                                          | 83        |
| 3.2.4.5      | Isolierung der Azohistidinverbindungen                                                                | 85        |
| 3.2.4.5.1    | Synthese                                                                                              | 85        |
| 3.2.4.5.2    | Trennung auf Dünnschicht-Kieselgelplatten                                                             | 86        |
| 3.2.4.5.3    | Andere Trennverfahren                                                                                 | 93        |
| <b>3.3</b>   | <b>Modifizierung der GDH<br/>mit p-Nitrodiazobenzol<br/>und Auftrennung der modifizierten Peptide</b> | <b>95</b> |
| <u>3.3.1</u> | <u>Plan</u>                                                                                           | 95        |
| <u>3.3.2</u> | <u>Enzymatischer Test</u>                                                                             | 98        |
| 3.3.2.1      | Testreaktion, Messung der Enzymaktivität                                                              | 98        |
| 3.3.2.2      | Enzymatischer Test modifizierter GDH                                                                  | 98        |
| 3.3.2.3      | Auffälligkeiten beim Test nativer GDH                                                                 | 99        |
| <u>3.3.3</u> | <u>Durchführung der Modifizierung</u>                                                                 | 102       |
| 3.3.3.1      | Kupplung bei pH 8                                                                                     | 102       |
| 3.3.3.2      | Blockierung der Enzymaktivität                                                                        | 103       |
| 3.3.3.3      | Spektren des modifizierten Proteins                                                                   | 107       |
| <u>3.3.4</u> | <u>Präparation modifizierter Peptide</u>                                                              | 110       |
| 3.3.4.1      | Kupplung der GDH mit p-Nitrodiazobenzol                                                               | 110       |
| 3.3.4.2      | Denaturierung und tryptische Spaltung                                                                 | 110       |
| 3.3.4.3      | Trennung der Peptide auf Kieselgelplatten                                                             | 111       |
| 3.3.4.4      | Aminosäureanalyse isolierter Peptide                                                                  | 114       |
| 3.3.4.5      | Trennung durch Gelfiltration und<br>Verteilungschromatographie (HPLC)                                 | 115       |
| <u>3.3.5</u> | <u>Versuche mit modifizierter GDH:<br/>Zusammenfassung und Diskussion<br/>der Ergebnisse</u>          | 117       |
| <u>3.3.6</u> | <u>Überlegungen zu weiterführenden Versuchen</u>                                                      | 120       |

|              |                                                                                               |     |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <u>4.</u>    | <u>Experimenteller Teil</u>                                                                   | 123 |
| 4.1          | Verwendete Materialien                                                                        | 123 |
| 4.2.         | Verwendete Puffer                                                                             | 123 |
| 4.3.         | Absolut- und Differenzspektrenmessung                                                         | 124 |
| 4.4.         | Diazotierung von Sulfanilsäure<br>und Kupplung mit N-Acetylhistidin                           | 125 |
| <u>4.4.1</u> | <u>Verwendete Lösungen</u>                                                                    | 125 |
| <u>4.4.2</u> | <u>Diazotierung von Sulfanilsäure</u>                                                         | 126 |
| <u>4.4.3</u> | <u>Kupplung mit N-Acetylhistidin</u>                                                          | 126 |
| 4.5          | Diazotierung von p-Nitroanilin<br>und Kupplung mit N-Acetylhistidin,<br>-tyrosin und -cystein | 128 |
| <u>4.5.1</u> | <u>Verwendete Lösungen</u>                                                                    | 128 |
| <u>4.5.2</u> | <u>Diazotierung von p-Nitroanilin</u>                                                         | 128 |
| <u>4.5.3</u> | <u>Kupplungsversuche mit N-Acetylhistidin</u>                                                 | 129 |
| <u>4.5.4</u> | <u>Kupplung von p-Nitrodiazobenzol<br/>mit N-Acetyltyrosin und N-Acetylcystein</u>            | 133 |
| 4.6          | Enzymtest                                                                                     | 134 |
| <u>4.6.1</u> | <u>Materialien</u>                                                                            | 134 |
| <u>4.6.2</u> | <u>Messung der Enzymaktivität</u>                                                             | 135 |



|              |                                                                                                                                                                                                 |            |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>4.7</b>   | <b>Modifizierung von GDH<br/>mit p-Nitrodiazobenzol</b>                                                                                                                                         | <b>135</b> |
| <u>4.7.1</u> | <u>Vorbereitung der GDH</u>                                                                                                                                                                     | 135        |
| <u>4.7.2</u> | <u>Kupplung der GDH mit p-Nitrodiazobenzol</u>                                                                                                                                                  | 136        |
| <u>4.7.3</u> | <u>Messung der Inaktivierung</u>                                                                                                                                                                | 136        |
| <u>4.7.4</u> | <u>Darstellung modifizierter GDH</u>                                                                                                                                                            | 137        |
| <u>4.7.5</u> | <u>Präparation tryptischer Peptide</u>                                                                                                                                                          | 137        |
| <b>4.8</b>   | <b>Angewandte Trennverfahren</b>                                                                                                                                                                | <b>139</b> |
| <u>4.8.1</u> | <u>Dünnschicht-Chromatographie der Azo-<br/>verbindungen von N-Acetylhistidin,<br/>N-Acetyltyrosin und N-Acetylcystein<br/>sowie von tryptischen Peptiden<br/>modifizierter und nativer GDH</u> | 139        |
| <u>4.8.2</u> | <u>Elution und Identifizierung von Peptiden</u>                                                                                                                                                 | 141        |
| <u>4.8.3</u> | <u>Gelfiltration der modifizierten Peptide</u>                                                                                                                                                  | 142        |
| <u>4.8.4</u> | <u>Trennung modifizierter tryptischer GDH-<br/>Peptide mit HPLC</u>                                                                                                                             | 142        |
| <b>4.9</b>   | <b>Aminosäurenanalyse</b>                                                                                                                                                                       | <b>142</b> |
| <u>5.</u>    | <u>Zusammenfassung</u>                                                                                                                                                                          | 143        |
| <u>6.</u>    | <u>Literaturverzeichnis</u>                                                                                                                                                                     | 145        |
| <u>7.</u>    | <u>Lebenslauf</u>                                                                                                                                                                               | 151        |

1. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

|          |                                                                   |
|----------|-------------------------------------------------------------------|
| GDH      | sn-Glycerin-3-phosphatdehydrogenase                               |
| LDH      | Lactatdehydrogenase                                               |
| GAPDH    | Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase                              |
| MDH      | Malatdehydrogenase                                                |
| ADH      | Alkoholdehydrogenase                                              |
| UE       | Untereinheit                                                      |
| NAD/NADH | Nicotinsäureamidadenindinucleotid (oxidierte/<br>reduzierte Form) |
| DAP      | Dihydroxyacetonphosphat                                           |
| AHC      | Ammoniumhydrogencarbonat (puffer)                                 |
| TCA      | Trichloressigsäure                                                |
| TRA (P)  | Triäthanolamin (puffer)                                           |
| EDTA     | Äthylendiamintetraessigsäure                                      |



## 2. Einleitung

Die cytosolische **sn-Glycerin-3-phosphatdehydrogenase** (GDH, EC 1.1.1.8) gehört zur großen Gruppe der NAD-abhängigen Dehydrogenasen. In dieser Arbeit wurde GDH aus Kaninchenmuskel untersucht. Das Enzym katalysiert folgende Reaktion:



Diese Reaktion ist wie alle Enzymreaktionen stereospezifisch.

Die Aminosäure-Sequenz dieses Proteins wurde 1978 von Otto et al. (41) veröffentlicht. Das Molekül besteht aus zwei identischen Untereinheiten (UE), die jeweils neun Histidine enthalten, und hat ein Molekulargewicht von 74954.

Im Organismus spielt die GDH an drei Stellen eine wichtige Rolle:

Zum einen stellt sie in den Zellen sn-Glycerin-3-phosphat aus Dihydroxyacetonphosphat, einem Zwischenprodukt der Glykolyse, für die Triglyzeridsynthese zur Verfügung. Dieser Syntheseweg spielt vor allem im Muskelgewebe eine Rolle, da dieses nicht, wie viele andere Gewebe (Leber, Niere, Darmmukosa) eine ausreichende Menge an Glycerokinase besitzt (33).

Zum zweiten ermöglicht die GDH, daß Reduktionsäquivalente, die bei der anaeroben Substratoxidation im Cytosol anfallen, über den sog. Glycerin-3-phosphatzzyklus in die Mitochondrien eingeschleust werden, obwohl NADH die Mitochondrienmembran nicht passieren kann. NADH wird im Cytosol oxidiert, wobei Glycerin-3-phosphat entsteht, das die äußere Mitochondrienmembran passiert und von der mitochondrialen GDH (= GP-Ox), die an der Außenseite der inneren Membran lokalisiert ist, oxidiert wird (30). Der Wasserstoff wird dabei auf FAD übertragen und kann somit in der Atmungskette verbrannt werden. Dihydroxyacetonphosphat kann das Mitochondrium wieder verlassen, um im Cytosol erneut Wasserstoff aufzunehmen. Dieser Zyklus ist v.a. im Flugmuskel der Wanderheuschrecke von Bedeutung, für den er von Bücher & Klingenberg (8) erstmals formuliert wurde, sowie möglicherweise in der Leber und im Gehirn (8,34).

Eine dritte Bedeutung der GDH liegt in der gleichfalls von Bücher & Klingenberg (8) beschriebenen Glycerinphosphat-Pyruvat-Dismutation:

Um zu verhindern, daß bei Sauerstoffmangel der Lactat/Pyruvat-Quotient in der Zelle zu stark ansteigt, wird, um das Redoxpotential der Zelle aufrechtzuerhalten, ein Teil des anfallenden NADH mit Hilfe der GDH oxidiert, um so erneut für die GAPDH-Reaktion in der Glykolyse zur Verfügung zu stehen (8,30,34).

Die NAD-abhängigen Dehydrogenasen sind eine sehr alte Proteinfamilie. Daher sind Ähnlichkeiten in der Primärstruktur zwischen den einzelnen Enzymen kaum noch zu erkennen (49).

Die durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärten Raumstrukturen verschiedener Dehydrogenasen zeigen jedoch deutliche Gemeinsamkeiten. So lassen sich die meisten der untersuchten Enzyme dieser Gruppe in eine NAD-bindende Domäne und eine katalytische Domäne unterteilen. Dies bedeutet, daß normalerweise diejenigen Aminosäuren, die zur Bindung des NAD während des katalytischen Vorgangs benötigt werden, in einem anderen Teil des Polypeptids liegen als diejenigen, die das Substrat binden. Diese Bindungsstelle wird als katalytische Domäne bezeichnet und enthält das Aktivitätszentrum.

Vergleicht man die NAD-bindenden Domänen verschiedener Dehydrogenasen, so kann man - besonders unter Berücksichtigung der Sekundärstrukturelemente - noch einige Homologien in der Aminosäure-Sequenz erkennen. Aufgrund der unterschiedlichen Struktur der Substrate läßt sich dies jedoch für die substratbindenden Domänen nicht erwarten (zitiert in (42)).

Dennoch ist bei den meisten der untersuchten Dehydrogenasen mindestens eine Histidin-Seitenkette an der Katalyse beteiligt:

Bei der LDH beispielsweise nimmt der Imidazolring des His-195 ein Proton von der Hydroxylgruppe des Lactat auf und kompensiert so die negative Ladung des benachbarten Asp-168. Dadurch wird dessen Wasserstoffbrückenbindung zum Substrat gelöst. Der kohlenstoffgebundene Wasserstoff und das bindende Elektroenenpaar werden von NAD übernommen (50).

In der GAPDH übernimmt das His-176 das Proton der halbacetalischen Hydroxylgruppe des Enzym-Substrat-Adduktes (37).

In der MDH ist in ähnlicher Weise eine Histidinseitenkette am Aktivitätszentrum beteiligt (4).

Auch in der ADH ist Histidin an der Wasserstoffübertragung beteiligt; allerdings ist hier das Substrat an ein Zinkatom im Aktivitätszentrum des Enzyms gebunden; von hier wird ein  $H^+$ -Ion an ein gleichfalls gebundenes  $H_2O$ -Molekül und von diesem über Wasserstoffbrückenbindungen über Serin an das an der Oberfläche gelegene Histidin weitergegeben (7).

Für die GDH wurde von Apitz-Castro und Suarez (2) aufgrund von Titrationsversuchen ebenfalls die Beteiligung eines Histidins an der Katalyse vermutet.

Otto et al. (40) isolierten 1977 ein Peptid der GDH, das in 5 Aminosäuren homolog war mit einer Sequenz aus Dornhai-LDH, die das am Aktivitätszentrum der LDH beteiligte His-193 enthält. Daher wurde vermutet, daß das entsprechende Histidin der GDH-Sequenz (Pos. 138 nach (41)) ebenfalls Teil des Aktivitätszentrums sei.

Neuere Arbeiten über GDH aus Hühnermuskel (69) und aus der Maus (31) zeigen jedoch einen isopolaren Austausch an dieser Position: beim Huhn findet sich an dieser Stelle Lysin, und bei der Maus Arginin, während die umgebende Aminosäure-Sequenz jeweils mit der Kaninchenmuskel-GDH übereinstimmt.

Bisher gelang es nicht, mit Hilfe einer Röntgenstrukturanalyse der GDH deren Raumstruktur aufzuklären, aber es ist möglich, die Primärstruktur des Enzyms mit den Enzymen zu vergleichen, deren Raumstruktur bereits aufgeklärt ist. Aus den so gewonnenen Daten wird die Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der eine vorliegende Aminosäuresequenz der GDH ein bestimmtes Sekundärstrukturmerkmal bildet (Faltblatt, Helix). Diese vermuteten "Enzymbausteine" können dann - z.B. anhand der bekannten Tertiärstruktur ähnlicher Enzyme - zu einem mutmaßlichen Modell des Enzyms zusammengesetzt werden.

Otto et al. (42) zeigten, daß sich im NAD-bindenden Bereich der GDH große Ähnlichkeiten der Tertiärstruktur mit anderen Dehydrogenasen (LDH, GAPDH, MDH, ADH) erwarten lassen.

Bei Vergleichen der katalytischen Domäne mit der anderer Dehydrogenasen zeigte sich eine unerwartet gute Übereinstimmung mit der Sequenz der GAPDH. Doch findet sich an Stelle des essentiellen (d.h. des an der Katalyse unmittelbar beteiligten) Histidins der GAPDH in der GDH-Sequenz ein Asparagin.

Es zeigte sich dann aber, daß das in die mutmaßliche Substratbindungsstelle hineinragende His-94, das allerdings der coenzymbindenden Domäne angehört, für diese Funktion in Frage kommen könnte.

Abb. 1 (reproduziert mit freundlicher Erlaubnis aus (42)) zeigt, daß auf diese Weise eine der räumlichen Struktur von sn-Glycerin-3-phosphat entsprechende Substratbindungsstelle entstehen würde.

Die Abbildung zeigt im Vergleich dazu die GAPDH mit ihrem Substrat Glycerinaldehydphosphat (9).

His-94 findet sich an der gleichen Stelle auch in der Sequenz der Maus-GDH und der GDH aus Hühnermuskel. Die in Abb. 1 an der vermuteten Substratbindung beteiligten Aminosäuren Asn-150 und Ser-153 finden sich an der gleichen Stelle der Sequenz bei den Enzymen aus Maus und Huhn (31,69).

Dies gibt erneut Hinweise dafür, daß His-94 und nicht, wie früher angenommen, His-138 am katalytischen Zentrum in der GDH wesentlich beteiligt ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, diese Hypothese zu überprüfen. Dazu sollte dasjenige Histidin dauerhaft chemisch markiert werden, das Teil des Aktivitätszentrums ist.

Als Folge der chemischen Modifizierung des Imidazolringes müßte die Enzymaktivität verloren gehen. Als Indikator für das Ausmaß der Blockierung wurde daher die Restaktivität der Enzymlösung herangezogen. In weiteren Versuchen sollte die Position des vorher markierten Histidins in der Aminosäuresequenz bestimmt werden.

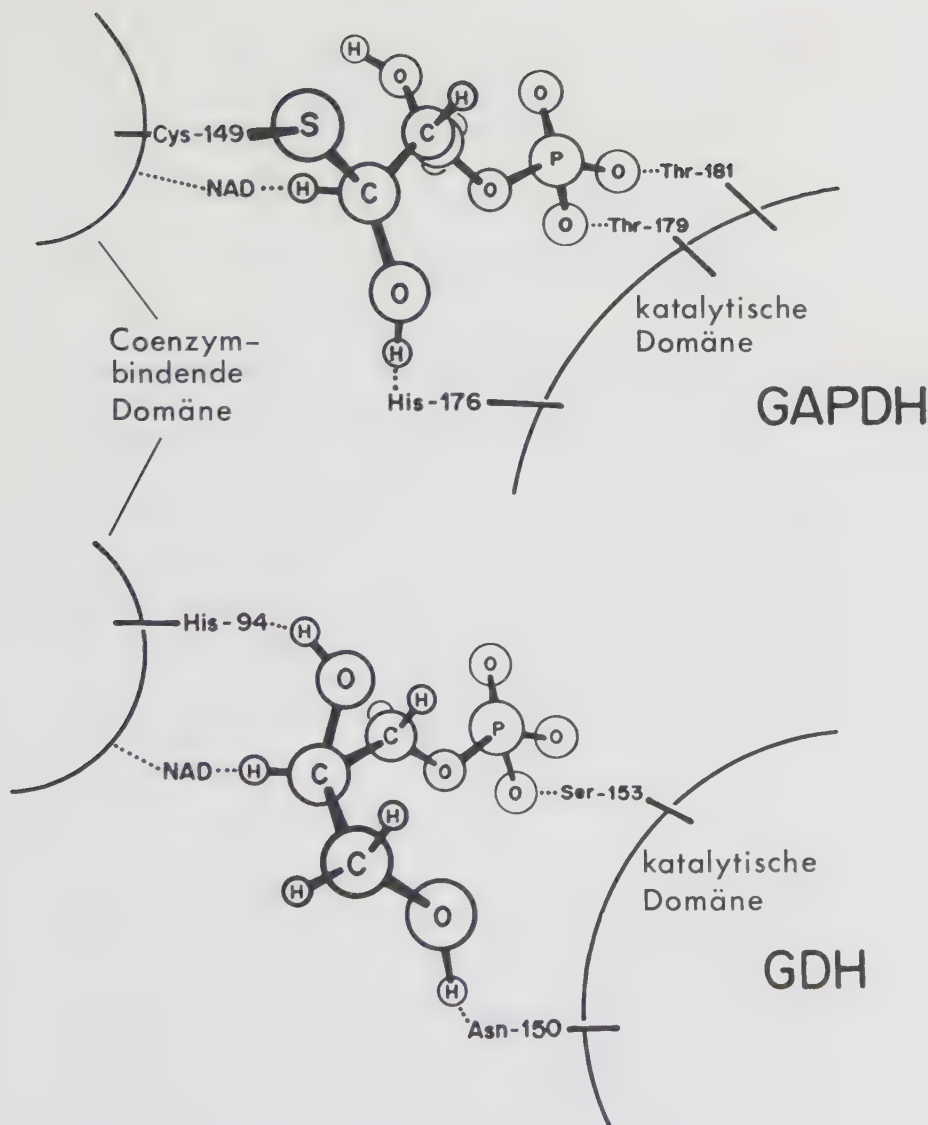


Abb. 1: Vermutete Konfiguration des Aktivitätszentrums der GDH; im Vergleich dazu Konfiguration des Aktivitätszentrums der GAPDH nach (9) (oben), reproduziert mit freundlicher Erlaubnis aus (42).



### 3. Markierung von Histidinseitenketten der GDH mit Diazoniumverbindungen: Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Methoden zur Modifizierung von Histidin

##### 3.1.1 Übersicht über die verschiedenen Verfahren

Bereits früh wurden in der Biochemie Proteine oder Proteinhydrolysate mit Reagenzien behandelt, die es erlaubten, einzelne Aminosäuren spezifisch nachzuweisen. Dies geschah oft anhand einer Farbreaktion.

##### 3.1.1.1 Pauly-Reaktion

Für den Nachweis von Histidin und Tyrosin beschrieb Pauly 1904 (44) die nach ihm benannte Reaktion, in der diazotierte Sulfanilsäure mit Histidin bzw. Tyrosin einen charakteristischen Farbton bildet. Doch auch andere Verfahren zum Nachweis von Histidin wurden beschrieben.

##### 3.1.1.2 Photooxidation

Zu diesen gehört die Photooxidation. Dies ist eine farbstoffvermittelte Oxidation, bei der ein zugegebener Farbstoff durch Lichteinfall angeregt wird und mit der aufgenommenen Energie bestimmte Verbindungen oxidiert werden können. Als Farbstoffe werden dabei u.a. Bengalrosa (2), Methylenblau (63) oder Proflavin (54) verwendet. Mit Hilfe dieser Mediatoren können die Seitenketten von Histidin, Tryptophan, Tyrosin, Cystein und Methionin oxidiert werden (36,54). Ob die jeweilige Seitenkette oxidiert wird, hängt von ihrem Protonierungsgrad ab.

Aus dieser pH-Abhängigkeit der mit der Oxidation meist verbundenen Inaktivierung des Enzyms läßt sich auf den pK der zerstörten funktionellen Gruppe schließen. Allerdings eignet sich die Methode nicht so sehr dazu, aus einem Gemisch von Peptiden dasjenige zu isolieren, das eine essentielle Seitenkette trägt, da diese bei der Oxidation zerstört wird.

#### 3.1.1.3 Diäthylcarbonat

Durch Umsetzung mit Diäthylcarbonat (15) läßt sich Histidin markieren und auch photometrisch nachweisen. Es entsteht N<sup>1</sup>-Carbethoxyhistidin, dessen Absorptionsmaximum bei 240 nm liegt. Für die ADH wurde von Dickenson & Dickinson die Beteiligung von Histidinseitenketten am Aktivitätszentrum untersucht (15).

#### 3.1.1.4 Halogenierung

Weiter ist es möglich, den Imidazolring des Histidins zu halogenieren; dies wurde u.a. von Edlbacher 1941 (16) mit Brom (Knoop-Reaktion nach Kapeller-Adler, (27)) und von Newman & Turnbull (38) mit Kaliumtrijodid durchgeführt. Allerdings wird vorzugsweise Tyrosin halogeniert, so daß dieser Nachweis für das in dieser Arbeit verfolgte Ziel nicht geeignet ist.

#### 3.1.1.5 Modifizierung mit 3-(2-Bromacetyl)-pyridin

Durch 3-(2-Bromacetyl)-pyridin lassen sich Proteine gleichfalls modifizieren. Den Reaktionsablauf zeigt Abb. 2 (nach (64)). Die entstehende Substanz kann nach Spaltung des Enzyms durch seine Absorption im UV-Bereich oder nach vorheriger radioaktiver Markierung des 3-(2-Bromacetyl)-pyridin nachgewiesen werden (64).

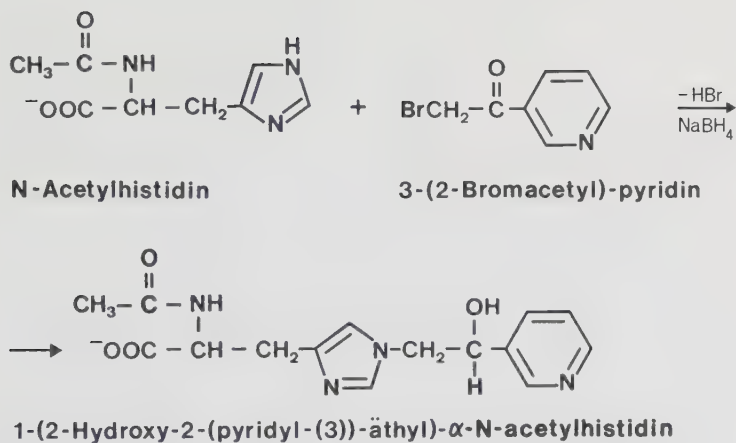


Abb. 2: Modifizierung von N-Acetylhistidin mit 3-(2-Bromacetyl)-pyridin

### 3.1.2 Eignung der verschiedenen Verfahren

Es zeigte sich, daß die Diazokupplung nach Pauly und die Reaktion von 3-(2-Bromacetyl)-pyridin mit Histidin diejenigen Verfahren waren, die für das angestrebte Ziel am besten geeignet schienen, da diese Methoden bereits an anderen Enzymen mit Erfolg zur Markierung und zum Nachweis von essentiellen Aminosäureseitenketten eingesetzt worden sind (5,10,64,65).

#### 3.1.2.1 Besonderheiten bei der Markierung von Proteinen mit 3-(2-Bromacetyl)-pyridin

Mit Bromketoverbindungen reagieren bevorzugt Cysteinreste (32,64). Histidin wurde von Woenckhaus et al. 1969 (64) mit Hilfe von 3-(2-Bromacetyl)-pyridin als essentielle Aminosäure bei der LDH nachgewiesen, nachdem die SH-Gruppen des Enzyms mit  $\text{HgCl}_2$  maskiert worden waren.

Zum Testen der Restaktivität des Enzyms nach der Modifizierung muß diese Quecksilberverbindung wieder entfernt werden.

Auch an der GDH sind bereits von verschiedenen Autoren (z.B. Telegdi & Keleti, (59)) Versuche durchgeführt worden, die Sulfhydryl-Gruppen zu blockieren und das Enzym anschließend zu reaktivieren.

Die erwähnten Autoren oxidierten die SH-Gruppen mit Hilfe von p-Chloromercuribenzoat, was zu einer vollständigen Inaktivierung des Enzyms führte. Innerhalb von 30 min. konnte durch Zugabe von Cystein die Enzymaktivität wieder vollständig hergestellt werden.

Bei einer längeren Inkubationszeit wurde offenbar die Raumstruktur des Enzyms zunehmend irreversibel verändert, da sich nach vier Stunden maximal noch 50% der Aktivität wiedergewinnen ließen.<sup>1)</sup>

### 3.1.2.2 Nachteile bei der Verwendung von 3-(2-Bromacetyl)-pyridin

Die reversible Inaktivierung des Enzyms ist jedoch nach Telegdi & Keleti gleichfalls auf eine (wenn auch reversible) Änderung der Raumstruktur des Enzyms zurückzuführen, so daß nicht davon ausgegangen werden kann, daß eine solche Maskierung die Zugänglichkeit von Aminosäureseitenketten unverändert läßt. Davon müßte man jedoch für die in dieser Arbeit angestrebte selektive Markierung ausgehen können.

In verschiedenen Enzymen, jedoch nicht in der GDH, sind nach der Maskierung von SH-Gruppen bereits essentielle Aminosäureseitenketten nachgewiesen worden (5,47,64,65), doch kann eine Methode, die sich zur Modifizierung eines Proteins bewährt hat, nicht ohne weiteres auf ein anderes Protein übertragen werden. Daher schien es sicherer, eine weniger eingreifende Methode anzuwenden.

Würde die Raumstruktur des Enzyms vor der Modifizierung wesentlich verändert, bestünde die Gefahr, daß auch nicht am Aktivitätszentrum beteiligte Aminosäureseitenketten für eine chemische Modifizierung leicht zugänglich würden.

-----  
<sup>1)</sup> Diese Ergebnisse konnten in eigenen Versuchen weitgehend bestätigt werden. Zur Maskierung wurde Dithionitobenzol (17) verwendet; die Reaktivierung wurde mit Hilfe von Dithiothreitol (13) durchgeführt. Darauf soll jedoch in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen werden.

Die selektive Markierung der zum Aktivitätszentrum gehörenden Aminosäureseitenketten, die deren im nativen Protein leichte Zugänglichkeit ausnützt, würde dadurch wesentlich erschwert werden.

Orientierende Versuche mit 3-(2-Bromacetyl)-pyridin zeigten zudem, daß 3-(2-Bromacetyl)-pyridin schwer in der erforderlichen Reinheit dargestellt werden kann. Eine Probe des nicht käuflichen Reagenzes stellte mir dankenswerterweise Herr P.D. Hensel vom Botanischen Institut der Universität zur Verfügung. Die Identifizierung der Reaktionsprodukte mit N-Acetylhistidin gelang auf Grund der Vielfalt der in der Dünnschichtchromatographie auftretenden Produkte nicht.

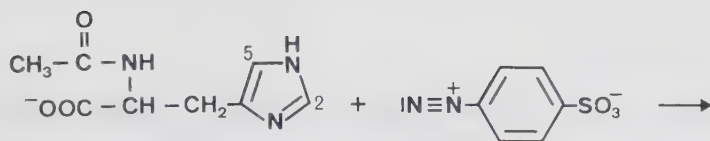
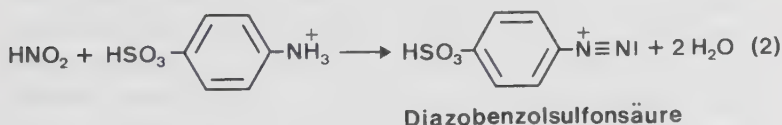
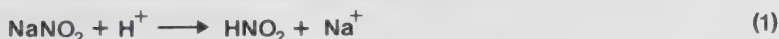
Eine daraufhin vermutete Verunreinigung des Reagenzes wurde in einem NMR-Spektrum bestätigt, für dessen Durchführung ich Herrn Dieter Schlosser vom Institut für Anorganische Chemie der Universität zu Dank verpflichtet bin.

### 3.1.2.3 Vorteile der Pauly-Reaktion

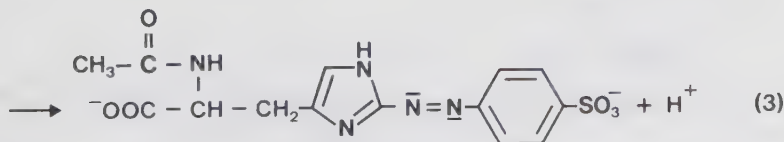
Aus diesen Gründen wurde der Methode nach Pauly der Vorzug gegeben. Histidin mit Diazoniumverbindungen zu kuppeln, hat neben einer einfacheren Handhabung (Maskierung von SH-Gruppen nicht von vorneherein notwendig) den Vorteil, daß eine im sichtbaren Licht absorbierende Verbindung entsteht, so daß eine radioaktive Markierung der Substanzen und aufwendige Nachweisverfahren nicht notwendig schienen.

### 3.1.3 Nachweis von Histidin und Tyrosin mit Hilfe von Diazoniumverbindungen

Der von Pauly erstmals beschriebene Nachweis für Histidin und Tyrosin mit Hilfe von Diazobenzolsulfonsäure wurde zur Anfärbung von histidinhaltigen Proteinen und Peptiden bzw. zum Nachweis von Histidin in Chromatogrammen verwendet. Eine Beschreibung findet sich z.B. bei Cramer (14). Hierbei können histidin- und tyrosinhaltige Peptide durch Ansprühen mit dem Reagenz und durch nachfolgende Alkalisierung sichtbar gemacht werden. Histidin ergibt dabei rote bis violette Flecken, Tyrosin braunrote Flecken, deren Farbe jedoch nach kurzer Zeit wieder verschwindet.



**N-Acetylhistidin**



**2-Mono-(azobenzolsulfonsäure)- $\alpha$ -N-acetylhistidin**

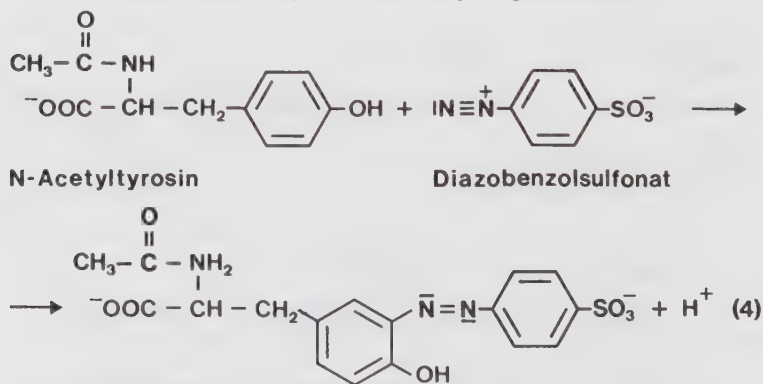
Abb. 3: Diazotierung von Sulfanilsäure (pH = ca. 1,5) und Kupplung mit N-Acetylhistidin (pH = ca. 10,5)

### 3.1.3.1 Reaktionsablauf

Die von Pauly angegebene Nachweismethode verwendet die folgenden chemischen Reaktionen (sh. Abb. 3):

Zunächst wird in salzsaurer Lösung bei 0°C Sulfanilsäure mit salpetriger Säure zu Diazobenzolsulfonsäure umgesetzt (diazotiert) (Gl.2).  $\text{HNO}_2$  entsteht durch Zugabe von  $\text{NaNO}_2$  zu dieser salzsauren Sulfanilsäurelösung. In einem zweiten Schritt (Gl.3) koppelt diese Diazoniumverbindung mit dem Imidazolring des N-Acetylhistidin bzw. dem Benzolring des N-Acetyltyrosins (Abb. 4, Gl.4); diese sog. Diazokupplung findet vorwiegend im basischen pH-Bereich statt.

Es entsteht Mono(azobenzolsulfonsäure)-N-acetylhistidin bzw. 2-Mono(azobenzolsulfonsäure)-N-acetyltyrosin (sh. Abb. 3 und 4). Durch die Erweiterung des konjugierten Systems verschiebt sich dessen Lichtabsorption in den sichtbaren Bereich (Bathochromie). Welches Atom des Imidazolringes mit der Diazoniumverbindung koppelt, ist umstritten. In der Abbildung 3 wurde die wahrscheinlichere Kupplung in Stellung 2 gezeichnet.



#### 3-Mono-(azobenzolsulfonsäure)- $\alpha$ -N-acetyltyrosin

Abb. 4: Diazokupplung von N-Acetyltyrosin mit Diazobenzolsulfonat (pH = ca. 10,5)

### 3.1.3.2 Zur Nomenklatur der entstehenden Verbindungen

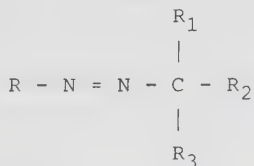
Es erscheint sinnvoll, eine kurze Übersicht über die verwendeten Bezeichnungen zu geben (nach Lehrbuch Beyer/Walter, (6)), da die in der Literatur verwendete Nomenklatur der Di-Stickstoffverbindungen z.T. mißverständlich ist und nicht immer einheitlich gehandhabt wird:

Eine Verbindung der Art

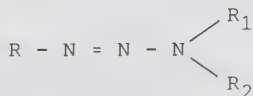


soll als **Diazonium**verbindung, Diazonium-Ion bzw. zusammen mit dem zugehörigen Anion als Diazoniumsalz bezeichnet werden.

Bei der Kupplung an einem C-Atom entsteht eine **Azo**verbindung mit der Struktur:



Findet die Kupplung an einem N-Atom statt, so soll die entstehende Verbindung **Diazoamin**verbindung genannt werden:



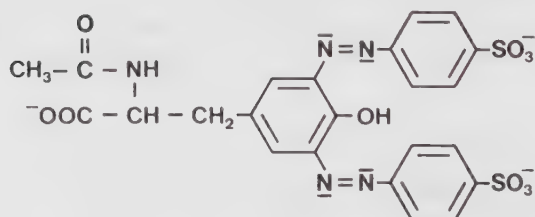
### 3.1.3.3 Reaktionsprodukte

#### 3.1.3.3.1 Mono- und Bisazoverbindungen

Bereits Pauly beschreibt 1915 (46), daß ein mol Tyrosin oder Histidin zwei mol einer Diazoniumverbindung zu binden vermag, so daß Bis(azobenzolsulfonsäure)tyrosin (Abb. 5) oder Bis(azobenzolsulfonsäure)histidin (Abb. 6) entsteht. Fraser und Higgins zeigten 1952 (23), daß es vom Konzentrationsverhältnis der Reaktionspartner abhängt, welches der beiden Produkte entsteht: wenn die Histidin-Konzentration größer als 1/2 der Diazobenzolsulfonsäurekonzentration ist, entsteht vorwiegend die Mono-Form des Farbstoffs, ist die Konzentration geringer, entsteht zunehmend mehr von der Bis-Form, wobei die zweite Kupplung schneller als die erste abläuft (23).

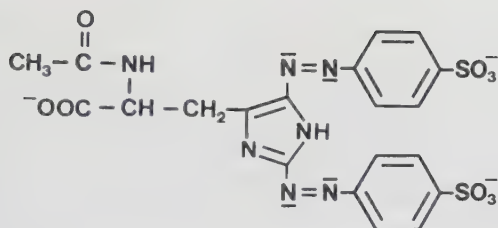
Mit Tyrosin kuppeln Diazoniumverbindungen jeweils in ortho-Stellung zur phenolischen Hydroxylgruppe (sh. Abb. 4 und Abb. 5) (44).

Abb. 5:



3,5-Bis-(azobenzolsulfonsäure)- $\alpha$ -N-acetyltyrosin

Abb. 6:



### 2,5-Bis-(azobenzolsulfonsäure)-α-N-acetylhistidin

#### 3.1.3.3.2 Mögliche Arten der Kupplung mit Histidin

Obwohl die Mehrzahl der Autoren (6,66 und andere) mit Pauly (44) davon ausgehen, daß die Kupplung der Diazoniumverbindungen mit Histidin an den in Abb. 3 und Abb. 6 gezeichneten C-Atomen des Ringes stattfindet, vertrat Burian (10) auf Grund von Kupplungsversuchen mit N- bzw. C-substituierten Imidazolderivaten die Ansicht, eine Kupplung könne nur an einem der Stickstoffatome stattfinden. Somit entstehe eine Diazoaminoverbindung. Im Lehrbuch von Gattermann (21) wird gleichfalls die Kupplung an einem N-Atom des Imidazolringes beschrieben.

Von den Diazoaminoverbindungen nimmt Pauly jedoch an, daß sie sich in Azoverbindungen umlagern, da diese weit stabiler seien. Die in der Literatur beschriebenen und auch in eigenen Versuchen beobachteten Farbänderungen einer Lösung von Azoverbindungen des N-Acetylhistidins könnten somit als Ausdruck dieser Umlagerungen bzw. des Zerfalls von Diazoaminofarbstoffen gedeutet werden.

### 3.1.3.3.3 Kupplung mit anderen Aminosäuren

Diazoniumverbindungen kuppeln jedoch auch mit anderen Aminosäuren als Histidin oder Tyrosin. Von Pauly (44) werden Reaktionen mit fast allen Aminosäuren beschrieben, doch dürfte es sich hier wohl um die (nicht sehr stabile) Kupplung mit der  $\alpha$ -Aminogruppe handeln, bei der ein intensiv gelber Farbton entsteht. Verwendet man  $\alpha$ -N-acetylierte Aminosäuren, so tritt eine Kupplung mit Cystein (12,26), Lysin ( $\epsilon$ -Aminogruppe) und Arginin (Guanidinogruppe) auf. Dabei geht u.U. Lysin eine Bisazo- und Arginin eine Triazoaminoverbindung ein (25,26). Auch mit dem Indolring des Tryptophans sind Kupplungsreaktionen beschrieben worden (25).

Von Burkhard et al. (11) wurde eine Kupplung mit Cystein, Lysin, Histidin und Tyrosin beschrieben. Bereits früher war Histidin in der LDH mit Hilfe von radioaktiv markierten Diazoniumverbindungen als essentielle Aminosäure nachgewiesen worden, nachdem die SH-Gruppen des Enzyms maskiert worden waren (47). Versuche von Smith & MacQuarrie (55) lassen annehmen, daß eine Cysteinseitenkette an der Bindung von NADH in der GDH beteiligt sein könnte.

Bei den von mir verwendeten Versuchsbedingungen konnte ich mit N-Acetylcystein allerdings keine Kupplung beobachten. Auch die Reaktion mit  $\alpha$ -N-Acetyllysin geht normalerweise zögernder als mit  $\alpha$ -N-Acetylhistidin vor sich, so daß man annehmen kann, daß bei den hier verwendeten niedrigen Diazoniumsalzkonzentrationen eine relativ spezifische Anfärbung von Histidin und Tyrosin möglich sein sollte.

### 3.1.3.4 Photometrische Bestimmung von Azoverbindungen

#### 3.1.3.4.1 Absorptionsmaxima der Verbindungen

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die Absorptionsmaxima von verschiedenen Azoverbindungen, wie sie in zwei zufällig ausgewählten Arbeiten berichtet werden. Die stark differierenden Werte für Mono-(azobenzolsulfonsäure)-histidin (mit \* bezeichnet) legen nahe, daß hier unter verschiedenen Reaktionsbedingungen aus gleichen Ausgangssubstanzen unterschiedliche Verbindungen entstanden sind. Dies macht bereits deutlich, daß eine exakte quantitative Kupplung von Histidin mit Diazoniumverbindungen nicht ohne weiteres möglich ist. Im nächsten Abschnitt wird auf die dabei auftretenden Schwierigkeiten näher eingegangen.

Die mit verschiedenen Diazoniumverbindungen auftretenden Unterschiede im Spektrum der Kupplungsprodukte zeigen, daß für eine genaue Messung zunächst die Absorptionseigenschaften der erwarteten Verbindungen bestimmt werden müssen.

Tabelle 1: Absorptionsmaxima (nm) verschiedener Azoverbindungen von Aminosäuren (siehe Abschnitt 3.1.3.4.1)

| Kupplung von<br>diazotierter<br><br>mit | Sulfanilsäure |              | Arsanilsäure |
|-----------------------------------------|---------------|--------------|--------------|
|                                         | nach<br>(23)  | nach<br>(48) | nach<br>(48) |
| Monoazohistidin                         | 380*          | 423*         | 420          |
| Bisazohistidin                          | 490           | 490          |              |
| Monoazotyrosin                          | 325           | 330/490      | 330 und 490  |
| Bisazotyrosin                           | 480           |              | 325 und 545  |
| Bisazolysin                             |               | 363          | 378          |

#### 3.1.3.4.2 Gegenseitige Überlappung der Spektren, Instabilität der Kupplungsprodukte

Von Frank & Peterson (20) wird die Beobachtung berichtet, daß in Papierchromatogrammen der mit Histidin entstehende Farbstoff nur einige Stunden stabil ist.

Die quantitative Bestimmung von Histidin bzw. Tyrosin in Lösungen ist seit je her problematisch. Zum einen verhindern die sich überlappenden Absorptionsbanden der Produkte eine einfache photometrische Bestimmung, zum anderen wird beschrieben, daß keine einheitlichen und stabilen Absorptionsspektren entstehen (27).

Edlbacher et al. (16) verwendeten daher organische Lösungsmittel, in denen die erhaltenen Farbstoffe eine Stunde stabil waren.

Bei Einsatz dieser Methode entstehen dennoch von Versuch zu Versuch unterschiedliche Spektren, selbst dann, wenn der Versuchsablauf und die Reaktionsbedingungen peinlich genau konstant gehalten werden. Mit dieser Methode sind daher nur Abschätzungen des Histidingehaltes einer Lösung möglich (16).

Ähnliche Beobachtungen werden auch von Kapeller-Adler beschrieben (27). Auf die möglichen Gründe für dieses Versagen der Methode soll weiter unten eingegangen werden.

#### 3.1.3.4.3 Verbesserte photometrische Bestimmungsmethoden für Histidin

Von Horinishi et al. (25) wird Diazo-1-H-tetrazol zur Kupplung verwendet, da diese Verbindung mit Histidin schneller als mit Tyrosin reagiert. Allerdings ist die Absorptionbande des Bisazotyrosins von der des Bisazohistidins nicht abtrennbar, so daß die Reaktion vor der Bildung von Bisazotyrosin gestoppt werden muß.

Bei der photometrischen Bestimmung des Histidins wird jedoch der Anteil des (bei ca. 400 nm absorbierenden) Monoazohistidins nicht erfaßt, wenn nur bei einer Wellenlänge gemessen wird. Im kurzwelligen Bereich würde die Messung jedoch durch die Absorption anderer Verbindungen (z.B. Monoazotyrosin) beeinflusst, so daß die Autoren hohe Konzentrationen der Diazoniumverbindung verwendeten, um alles vorhandene Histidin in Bisazohistidin umzusetzen.

Dies allerdings würde eine selektive Markierung der am leichtesten reagierenden Aminosäure verhindern, wie es in dieser Arbeit angestrebt wurde, da bei Verwendung höherer Konzentrationen auch andere als die am Aktivitätszentrum beteiligten Aminosäureseitenketten mit dem Reagenz reagieren würden. Daher war diese Methode nicht anwendbar.

Von Takenaka et al. (58) und Riordan et al. (48) wurden die Absorptionen der verschiedenen Verbindungen bei zwei Wellenlängen und bei pH 8 und pH 10 gemessen. Mit Hilfe eines Gleichungssystems können die vorhandenen Konzentrationen von Histidin und Tyrosin exakt bestimmt werden (unabhängig vom Verhältnis der enthaltenen Mono- und Bisazoverbindungen). Voraussetzung für diese Messung ist, daß die Extinktionskoeffizienten aller in Frage kommenden Verbindungen für diese Wellenlängen und die entsprechenden pH-Werte bekannt sind.

Daher müssen diese Verbindungen rein dargestellt werden, um die bei der Kupplung von Diazoniumverbindungen mit den Seitenketten eines Enzyms entstehenden Verbindungen photometrisch quantitativ bestimmen zu können.

### 3.1.3.5 Mögliche Ursachen für die Instabilität der Azohistidinverbindungen

#### 3.1.3.5.1 Kupplung mit Dediazonierungsprodukten

Diazoniumsalze sind in wäßriger Lösung nicht stabil. Wie weiter unten beschrieben, sind sie in saurer Lösung bei 0°C einige Stunden haltbar, in alkalischen Lösungen (pH < 11) zerfallen sie jedoch relativ rasch (51,67). Die dabei ablaufende Reaktion wird als **Dediazonierung** bezeichnet.

Nach Zollinger (67) entstehen dabei in diesem pH-Bereich viele schwer identifizierbare polymere Produkte. Ferner seien Versuche mit Diazoniumverbindungen in diesem Bereich nicht leicht reproduzierbar.

Art und Geschwindigkeit der ablaufenden Reaktionen sowie die Natur der entstehenden Produkte seien in hohem Maße abhängig vom Material der Reaktionsgefäße, Lichteinfall und Atmosphäre. Neben Stickstoff beeinflusst **Sauerstoff** bereits in Konzentrationen von 10 ppb entscheidend den Reaktionsablauf.

Auch Art und Konzentration des verwendeten Puffers, Anwesenheit organischer Lösungsmittel und anderer gelöster Komponenten sowie Temperatur und pH haben entscheidenden Einfluß auf die Produktbildung der Dediazonierungsreaktionen.

Diese Randbedingungen sind mit der offenbar erforderlichen Genauigkeit nur schwer kontrollierbar.

Es entstehen verschiedene Verbindungen, deren Struktur bisher nicht erforscht ist, von denen jedoch angenommen werden kann, daß sie z.T. selbst in den gemessenen Wellenlängenbereichen absorbieren, z.T. auch mit den noch vorhandenen Diazokomponenten kuppeln und so weitere nicht bekannte Farbstoffe bilden.

Dies führt zu der Beobachtung einer Instabilität des von der Lösung gemessenen Spektrums. Versuchsergebnisse sind unter diesen Voraussetzungen nur schwer reproduzierbar, wie aus der Literatur bekannt ist.

Durch den Verbrauch eines Teils der Diazoniumverbindung verändert sich deren Verhältnis zum Kupplungspartner in nahezu nicht kontrollierbarer Weise. Dadurch variiert der Anteil der entstehenden Mono- bzw. Bisazoverbindungen.

Neben der direkten Veränderung des Spektrums einer solchen Azoaminosäurelösung durch Nebenprodukte der Kupplungsreaktion ist dies ein weiterer Grund für die von verschiedenen Autoren beschriebenen Schwierigkeiten und Fehler, die beim Versuch der quantitativen photometrischen Bestimmung von Histidin mit Hilfe der Diazokupplungsreaktion auftreten.

Die Dediazonierungsreaktionen und darauffolgende Kupplungsreaktionen beeinflussen die Spektren von Azo-histidinlösungen. Besonders die Messung von Differenzspektren (gegen eine Referenzlösung, der nur die Diazoniumverbindung, nicht aber N-Acetylhistidin zugegeben wurde) wird durch diese Folgereaktionen gestört:

In der Referenzlösung werden keine Diazoniumionen verbraucht; daher können dort Zerfalls- und darauf folgende Kupplungsvorgänge vermehrt stattfinden. Nach Zollinger (67) sind auch autokatalytische Prozesse bei der Dediazonierung beobachtet worden. Durch die höhere Konzentration an Diazoniumionen in der Referenz würden diese dort überproportional schneller ablaufen.

Die beschriebenen Vorgänge können im Lauf von Minuten zur Verfärbung von Diazoniumsalzlösungen führen. Von verschiedenen Autoren (z.B. Horinishi et al. (25), s.a. eigene Versuche: Abschn. 3.2.3) wurde für Diazobenzolsulfonsäurelösungen eine innerhalb von 10 bis 30 min. auftretende Gelbfärbung beobachtet.

Das von Horinishi et al. (25) statt Diazobenzolsulfonsäure auch verwendete Diazo-1-H-tetrazol kuppelt jedoch offensichtlich nicht mit den beim Zerfall entstehenden Produkten, wie dies für Diazobenzolsulfonsäure anzunehmen ist, da die Autoren mit Diazo-1-H-tetrazol keine entsprechende Verfärbung der Lösungen beobachteten.

Die beschriebenen Prozesse in Probe und Referenz verschlechtern die Reproduzierbarkeit der Differenzspektren von Azohistidinlösungen erheblich.

#### 3.1.3.5.2 Entstehung von Diazoaminoverbindungen

Pauly (45) hielt die Entstehung von Diazoaminoverbindungen durchaus für möglich; da er jedoch eine große Hitze- und Säurebeständigkeit der mit Histidin entstehenden Farbstoffe gefunden hatte, vertrat er die Ansicht, daß sich entstehende Diazoaminoverbindungen u.U. zu den stabileren Azoverbindungen umlagern könnten. Die von verschiedenen Autoren (16, 27 und andere; eigene Versuche sh. Abschn. 3.2.3.4 bzw. 3.2.4.2) beobachtete Instabilität der gemessenen Spektren muß demnach zumindest zu einem Teil auf Umlagerungs- und Zerfallsprozesse des evtl. zunächst oder unter bestimmten Bedingungen entstehenden Diazoaminofarbstoffes zurückzuführen sein. Nach Pauly (46) ist auch eine gemischte Diazoazoverbindung denkbar.

### 3.1.3.5.3 Endprodukte ohne -N=N-C-Bindung (Azogruppe)

Bei der Modifizierung von Proteinen mit Hilfe von Diazobenzolarsinsäure stellten Gelewitz et al. (22) fest, daß mehr Arsen in das Protein eingebaut wurde, als auf Grund der Bestimmung der eingeführten N=N-Bindungen (Reduktion mit Titanchlorid nach Siggia (52) und photometrische Messung der Azokomponenten) zu erwarten gewesen wäre. Zum Teil ist dies sicher auf Kupplungsreaktionen der Diazoniumverbindung mit Lysin zurückzuführen, könnte aber auch Ausdruck von Umlagerungsreaktionen des Azofarbstoffes sein, die die von Edlbacher et al. (16) erwähnten Instabilitäten des Absorptionsspektrums erklären könnten.

Die Ergebnisse von Gelewitz et al. (22) können mit zur Erklärung der von Riordan (48) erwähnten Erfahrung beitragen, wonach bei der Modifizierung von Proteinen mit Hilfe von Diazoniumverbindungen häufig nicht die erwarteten distinkten Absorptionsmaxima einzelner Farbstoffe, sondern nur ein breites Absorptionsband auftritt. Diese Beobachtung ist zu einem großen Teil sicher auch auf Nachbargruppeneffekte im Protein zurückzuführen, die die spektralen Eigenschaften der entstandenen Farbstoffe verändern können und so deren photometrische Identifizierung erschweren.

Dennoch gelang es Burkhard et al. (11), im Spektrum von Dehydrogenasen, die mit Diazoniumverbindungen modifiziert worden waren, die umgesetzten Aminosäuren quantitativ nachzuweisen. Mit der GDH wurden solche Versuch bisher nicht durchgeführt.

### 3.1.3.6 Bekannte Verfahren zur Stabilisierung von Azohistidinverbindungen

Edlbacher et al. (16) verwendeten organische Lösungsmittel zur quantitativen Histidinbestimmung. Die Stabilität der Azohistidinfarbstoffe betrug 30 - 60 min.

Eine weitere Verbesserung der Stabilität konnte erreicht werden, indem von McPherson (35) konzentriertes  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und Alkohol zur wäßrigen Lösung gegeben wurden. Dadurch wurden organische Lösungsmittel vermieden.

Sluyterman (53) modifizierte diese Methode und führte Histidinbestimmungen für verschiedene Proteine durch. Dem Autor zufolge bleiben die Reaktionsprodukte stabil. Durch Messungen konnte er nachweisen, daß der Sauerstoffgehalt der Lösungen zum Zeitpunkt der Kupplung die Stabilität des Farbstoffes herabsetzt.

### 3.1.3.7 Die Diazokupplung mit N-Acetylhistidin: Zusammenfassung der Literaturübersicht

Der Nachweis von Histidin mit Hilfe von Diazoniumverbindungen ist seit langer Zeit bekannt. Durch die Vielfalt der entstehenden Produkte und deren Unbeständigkeit wird die Photometrie der Reaktion erschwert.

Die bei der Kupplung mit N-Acetylhistidin und beim Zerfall der Produkte ablaufenden Vorgänge sind nur zum Teil (Dediazonierung) erforscht. Die sie bestimmenden Randbedingungen (Temperatur, Licht, pH) wurden bisher nur ansatzweise erforscht. Lediglich der Einfluß des Sauerstoffgehalts der Lösung auf die Stabilität wurde untersucht (53).

### 3.1.3.8 Anforderungen an die in dieser Arbeit einzusetzende Nachweismethode

Die Methode zur Markierung von Histidin mußte folgende Anforderungen erfüllen, damit das Ziel dieser Arbeit, die Identifizierung des am Aktivitätszentrum der GDH beteiligten Histidins, erreicht werden konnte:

- 1) Es mußte geprüft werden, ob es möglich sei, abweichend von der Versuchsanordnung Sluytermans (53), die Diazoniumsalzlösung zur Kupplung in die leicht basische Enzymlösung einzubringen, da das Enzym in der zur Herstellung von Diazoniumsalzen notwendigen salzsauren Lösung denaturiert werden würde (18).
- 2) Der entstehende Farbstoff mußte über mehrere **Tage** stabil bleiben, damit während der Aufarbeitung des mit dem Farbstoff modifizierten Proteins keine Farbänderung auftreten würde.
- 3) Es mußte sichergestellt werden, daß die Farbstoffbildung reproduzierbar ablief, damit photometrisch die Menge der in das Enzym eingebrachten Azogruppen gemessen und die modifizierten Aminosäuren bestimmt werden könnten, wie dies von Burkhardt et al. (11) für die LDH und andere Dehydrogenasen durchgeführt wurde.

Dazu mußten Modellverbindungen von allen in Frage kommenden Aminosäuren hergestellt werden und deren Absorptionsspektren und Extinktionskoeffizienten bestimmt werden, wie dies im Abschnitt 3.1.3.4.1 erläutert ist.

Zusätzlich wurden die Modellverbindungen benötigt, um ihr Verhalten während der Aufarbeitung des Proteins zu untersuchen und auftretende Spaltprodukte mit diesen Modellverbindungen vergleichen zu können.

- 4) Nach der Arbeit von Apitz-Castro (2) ist es wahrscheinlich, daß Histidin wesentlich an der Katalyse in der GDH beteiligt ist. Es ist zu erwarten, daß bei geringem Überschuß des Diazoniumsalzes zunächst diese exponierte Aminosäureseitenkette reagiert und andere Seitenketten (z.B. von Tyrosin) nur in geringem Umfang modifiziert werden.

Als weitere am Aktivitätszentrum beteiligte Aminosäuren sind nach (42) Asparagin und Serin zu erwarten, von deren Seitenketten keine Reaktionen mit Diazoniumverbindungen bekannt sind. Bei Verwendung geringer Mengen der Diazoniumverbindung kann daher die Spezifität des gewählten Nachweisverfahrens als genügend groß angesehen werden.

### 3.2            **Modifizierung von Aminosäuremodell- verbindungen**

#### 3.2.1        Ziel der Versuche

Es mußte ein Verfahren zur Diazokupplung der Aminosäurereste der GDH gefunden werden, das hinsichtlich des pH-Bereichs der Kupplung, sowie der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und der Stabilität der entstehenden Produkte den oben aufgeführten Anforderungen genügte. Zunächst wurden Versuche mit  $\alpha$ -N-acetylierten Aminosäuren durchgeführt. Der Essigsäurerest verhindert die Entstehung von Diazoaminoverbindungen an der  $\alpha$ -Aminogruppe.

Es sollten Modellverbindungen der bei der Enzymmodifizierung möglicherweise entstehenden Azo-Aminosäureverbindungen rein dargestellt werden. Die Kenntnis ihrer Absorptionseigenschaften sollte es erlauben, photometrisch zu bestimmen, in welchem Ausmaß die in Frage kommenden Seitenketten der GDH bei der Modifizierung zu Azoverbindungen umgesetzt werden.

Anhand dieser Messungen sollte die Modifizierung so gesteuert werden, daß nur eine einzige Aminosäureseitenkette umgesetzt würde, wie es für eine spezifische Markierung des Aktivitätszentrums zu fordern ist.

Zudem würde bei der Aufarbeitung des modifizierten Proteins die Identifizierung der markierten Aminosäuren erleichtert, wenn sie mit den entsprechenden Modellverbindungen verglichen werden könnten.

### 3.2.2 Messung von Differenzspektren

Mißt man das Spektrum des Reaktionsgemisches nach der Kupplung von N-Acetylhistidin mit einer Diazoniumverbindung bei alkalischem pH gegen  $H_2O$ , so werden die Absorptionsbanden dieser Histidinverbindungen von der Grundabsorption der Lösung weitgehend überdeckt, wie Abb. 7 für die Verbindungen von diazotierter Sulfanilsäure mit N-Acetylhistidin zeigt.

Erst bei Verwendung sehr großer Mengen von N-Acetylhistidin läßt sich das Absorptionsmaximum der Azo-histidinverbindung eindeutig abgrenzen.

Bei der Modifizierung der GDH würde die Konzentration des Histidins, dessen Seitenkette mit einer Diazoniumverbindung kuppeln sollte, sehr gering sein. Daher mußte das Meßverfahren, mit dem die Kupplung registriert werden sollte, auch bei so geringer Konzentration auswertbare Ergebnisse erbringen.

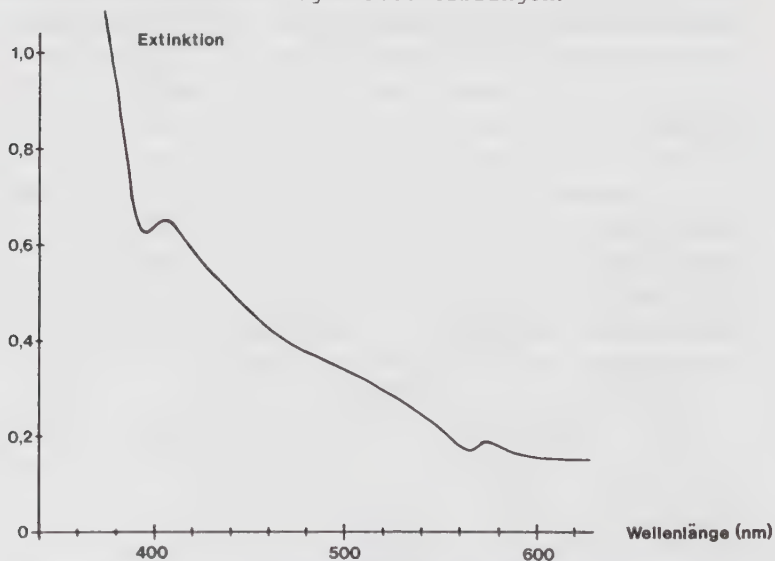


Abb. 7: Kupplung von N-Acetylhistidin mit Diazobenzolsulfonsäure: Spektrum der Reaktionslösung (pH 10) gegen Wasser

Es wurden deshalb die Spektren der Reaktionsgemische nach Kupplung der N-acetylierten Aminosäuren mit der Diazoniumverbindung, sofern nicht anders erwähnt, gegen eine gleich behandelte Referenzlösung gemessen, die mit Ausnahme der N-acetylierten Aminosäure die gleichen Reagentien wie die Probenlösung enthielt. Mit dem gleichen Verfahren wurde dann auch der Einbau der Azogruppe in die GDH gemessen.

Da in der Referenz keine Kupplung mit N-Acetylhistidin stattfindet, bei der Diazoniumionen verbraucht würden, laufen dort Dediazonierungsprozesse und Reaktionen der entstehenden Produkte in größerem Umfang als in der Probenlösung ab. Dies wurde unter 3.1.3.5 diskutiert.

Daraus erklärt sich, daß die Extinktionsdifferenz im Wellenlängenbereich unter 400 nm in manchen der gezeigten Spektren negativ ist. Dieses Phänomen verhindert die exakte Messung der Absorption von Reaktionsprodukten in diesem Bereich.

Dennoch wurde wegen der insgesamt besseren Meßbarkeit des Spektrums der bei der Kupplungsreaktion entstehenden Verbindungen diese Meßmethode beibehalten. Die exakten Spektren von Mono- und Bisazohistidin<sup>1)</sup> sollten dann an den rein dargestellten Verbindungen gemessen werden, wie unter 3.1.3.8 erläutert wurde.

-----  
1) Von Monoazo- $\alpha$ -N-acetylhistidin soll vereinfachend immer als **Monoazohistidin** (für andere N-acetylierte Aminosäuren entsprechend) gesprochen werden. Andere als  $\alpha$ -N-acetylierte Aminosäuren wurden für die Kupplungsversuche nicht verwendet.

### 3.2.3 Modifizierung von Histidin mit diazotierter Sulfanilsäure

#### 3.2.3.1 Spektrum von Diazobenzolsulfonsäure

Zunächst wurde ein Spektrum von Diazobenzolsulfonsäure gemessen. Diazotiert wurde in 0,15 N HCl.

Abb. 8 zeigt das Spektrum gegen 0,15 N HCl. Der Extinktionskoeffizient für das Hauptmaximum bei 269 nm beträgt  $E = 1,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Die Absorptionsbanden bei 205 nm sowie zwischen 340 nm und 400 nm sind auf den Restgehalt von  $\text{HNO}_2$  zurückzuführen.

Die maximale Konzentration von Diazobenzolsulfonsäure ist 5 min. nach der Zugabe von  $\text{NaNO}_2$  erreicht und bleibt bei 0°C in 0,15 N HCl für mehrere Stunden konstant. Die Lösung ist auch in wäßriger Verdünnung solange haltbar.

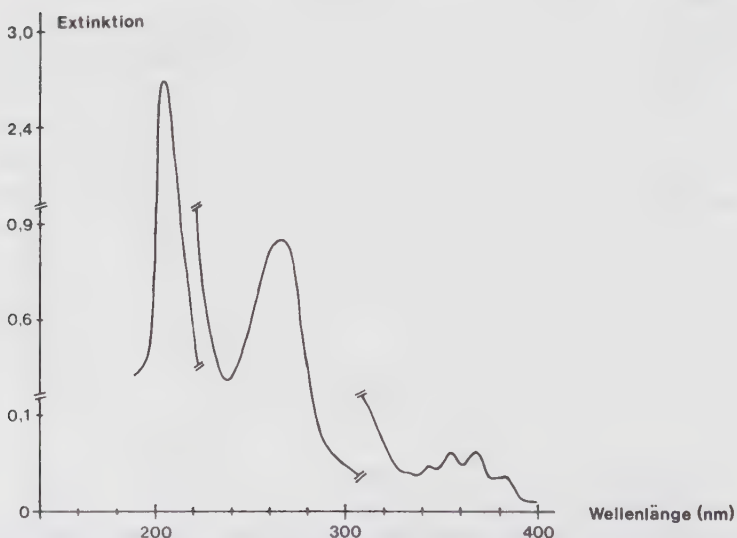


Abb. 8: Spektrum von Diazobenzolsulfonsäure (in 0,15 N HCl) gegen 0,15 N HCl

Von anderen Autoren war diese Messung bisher nicht beschrieben worden; die Stabilität wurde anhand einer Kupplungsreaktion bestimmt und mit größer als 1 h angegeben. In TRA/EDTA-Puffer bei pH 7,6 findet man ein Spektrum wie in Abb. 9, worin die Absorptionsbande des Diazobenzolsulfonat auf 315 nm verschoben ist.

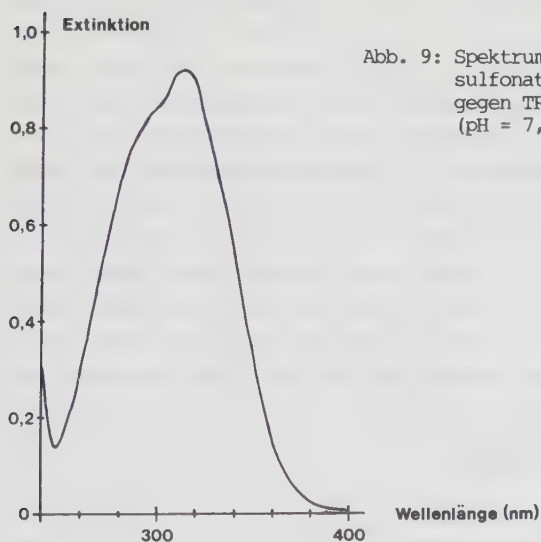


Abb. 9: Spektrum von Diazobenzolsulfonat in TRA/EDTA-Puffer gegen TRA/EDTA-Puffer (pH = 7,6)

### 3.2.3.2 Kupplungsprodukte, mangelnde Stabilität

Die Kupplung von N-Acetylhistidin mit Diazobenzolsulfonsäure führt wahrscheinlich zu den in Abb. 3 und Abb. 6 gezeigten Verbindungen Mono-(azobenzolsulfonsäure)-N-acetylhistidin und Bis-(azobenzolsulfonsäure)-N-acetylhistidin (zur Kupplungsreaktion sh. 3.1.3.1). Diese Verbindungen sollen in diesem Kapitel mit **Mono-** (bzw. **Bis-**) **azohistidin** bezeichnet werden. **Azohistidin** soll ein Oberbegriff für diese beiden Verbindungen sein.

Wie weiter oben erläutert wurde, ist seit langem bekannt, daß die Produkte der Kupplungsreaktion nicht stabil sind und ihre Farbe im Verlauf kurzer Zeit verlieren.

Wird in einer salzsauren Lösung von frisch hergestelltem Diazoniumsalz N-Acetylhistidin durch Zugabe von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  die Kupplung eingeleitet, so verfärbt sich die Lösung in wenigen Sekunden rötlich, verliert jedoch innerhalb einiger Minuten ihre Farbe. Diese Zeitdauer ist von Versuch zu Versuch unterschiedlich.

In variablem Umfang tritt eine Gelbfärbung der Probe und der Referenzlösung (die kein N-Acetylhistidin enthält) ein.

Abb. 10 zeigt ein Differenzspektrum einer Lösung von Azohistidin kurz nach Kupplungsbeginn (d.h. nach Zugabe von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), Kurve (1), sowie nachdem sich die Probenlösung entfärbt hatte, Kurve (2). Zur Messung von Differenzspektren sh. 3.2.2.

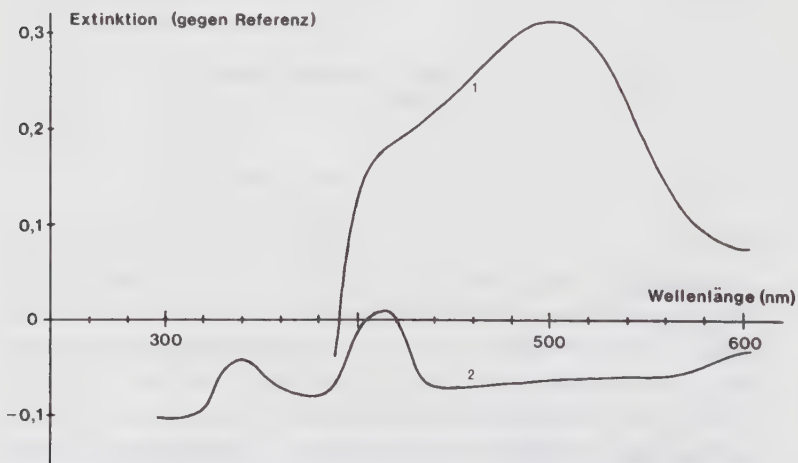


Abb. 10: Spektren einer Lösung von Azohistidin gemessen gegen Referenz (siehe dazu 3.2.2):  
(1) kurz nach Kupplungsbeginn  
(2) nach Entfärben der Lösung (sh. Text)

Die Extinktionsdifferenz steigt im Bereich des Absorptionsmaximums um 500 nm zunächst an, und fällt dann innerhalb von ca. 10 min. wieder ab, um in einem Teil der Versuche im gesamten Wellenlängenbereich negative Werte zu erreichen, wie in Abb. 10 gezeigt ist.

### 3.2.3.3 Ergebnisse mit dem Verfahren nach Sluyterman

Von einer Reihe von Autoren ist versucht worden, die seit langem bekannte Instabilität der Azohistidin-sulfonsäureverbindungen zu verbessern. In dieser Arbeit wurde von einem Verfahren ausgegangen, das von Slyuterman (53) beschrieben worden ist. Dem Autor zufolge kann damit die bekannte Unbeständigkeit von Azohistidinverbindungen verringert werden.

Nach den Messungen dieses Autors ist der  $O_2$ -Gehalt der Lösung zum Zeitpunkt der Kupplung bestimmend für die Stabilität der entstehenden Azoverbindungen.

Die Reaktanden werden nach dieser Methode im sauren Milieu vereinigt; N-Acetylhistidin kuppelt mit der Diazogruppe vorwiegend im basischen pH-Bereich. Zur Kupplung wird entweder 20%ige oder entgaste 5%ige  $Na_2CO_3$ -Lösung zugegeben (ohne Luftsauerstoff dabei in die Lösung einzubringen). Der pH in dieser Lösung beträgt dann ca. 10.

N-Acetylhistidin kuppelt innerhalb weniger Sekunden; die Lösung färbt sich deutlich rot. Nach exakt zwei Minuten wird eine 75%ige Ethanolllösung zugegeben; dies erhöht nach McPherson (35) die Stabilität des Farbstoffes. Dabei färbt sich die Lösung orange.

Sluytermann (53) zufolge sind die so hergestellten Azoverbindungen stabil.

Bei der Zugabe der  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung und nochmals bei der Zugabe von Ethanol fällt ein Teil des  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  aus, was vom Autor nicht beschrieben wird. Die in Abb. 11 gezeigten Spektren sind vom Überstand der entsprechenden Ansätze gemessen. Sie waren in der Lage des Hauptmaximums über mehr als eine Woche stabil, veränderten sich jedoch beträchtlich in der Höhe des Absorptionsmaximums.

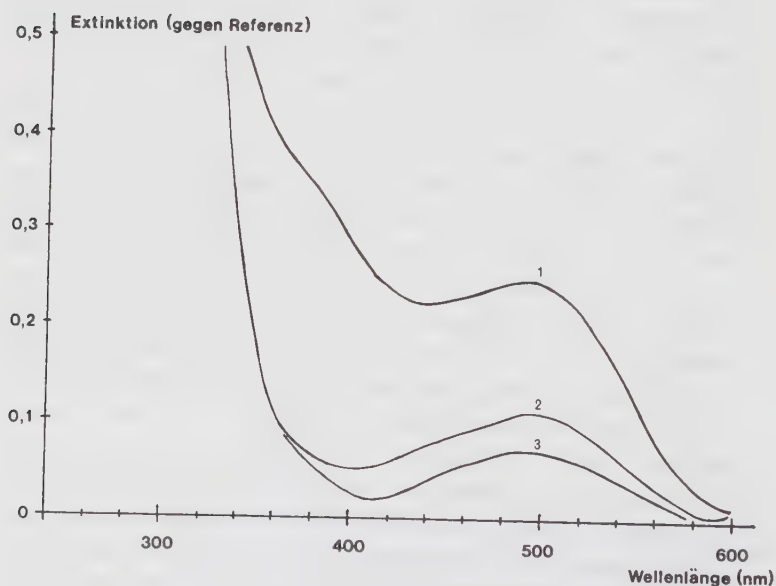


Abb. 11: Spektren einer Azohistidinlösung gegen Referenz:  
(1) direkt nach Zugabe von Ethanol  
(2) 1 Tag später  
(3) 7 Tage später

### 3.2.3.4 Variationsversuche und deren Ergebnisse

1) Zunächst wurde versucht, das Ausfallen von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  zu verhindern. Sulfanilsäure wurde in 0,15 N HCl gelöst. Dadurch wird die im Ansatz enthaltene Säuremenge reduziert, wodurch weniger  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  zugegeben werden muß, um den für die Kupplungsreaktion gewünschten pH von ca. 10 zu erreichen. Zusätzlich wurde statt 75%igem Ethanol 20%iges Ethanol verwendet, um die Löslichkeit des  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in dem Ansatz zu erhöhen.

Ein Teil der von diesen Ansätzen gemessenen Spektren wich unterhalb von 500 nm von dem in Abb. 11 gezeigten Bild ab, und ist in Abb. 12 dargestellt.

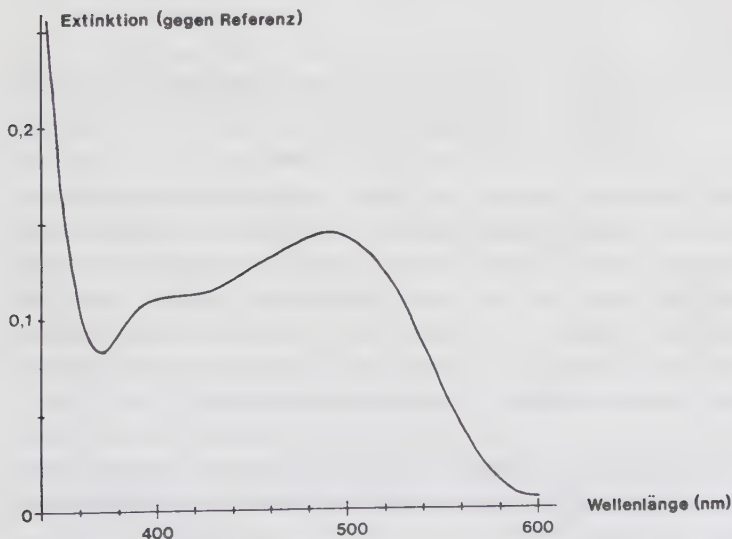


Abb. 12: Von Abb. 11 abweichendes Spektrum einer Azohistidinlösung (gleiche Bedingungen, Messung bei pH 10,5, sh. Text)

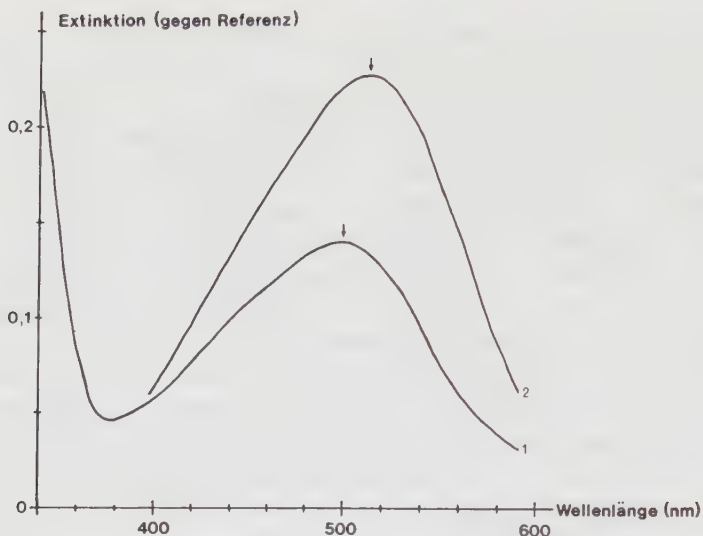


Abb. 13: Verschiebung des Absorptionsmaximums einer Azohistidinlösung:  
(1) sofort nach Ende des Versuchs, Maximum bei 495 nm  
(2) Messung 4 Tage später, Maximum bei 515 nm

Die Spektren waren z.T. über mehrere Tage konstant, andere Ansätze veränderten sich jedoch im Verlauf einiger Zeit. Dabei verschob sich das Absorptionsmaximum von 495 nm beispielsweise auf 515 nm (sh. Abb. 13, Kurve (1) und (2)), oder auch zu kürzeren Wellenlängen hin, ohne daß eine Änderung der Versuchsbedingungen stattgefunden hätte.

2) Die Geschwindigkeit der Zugabe von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  hatte erheblichen Einfluß auf das entstehende Spektrum, wie Abb. 14 zeigt.

Hier war  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  langsam und tropfenweise zugegeben worden. Das Spektrum zeigt beinahe im gesamten Wellenlängenbereich eine negative Extinktionsdifferenz; das relative Maximum ist gegenüber den anderen Versuchen verschoben.

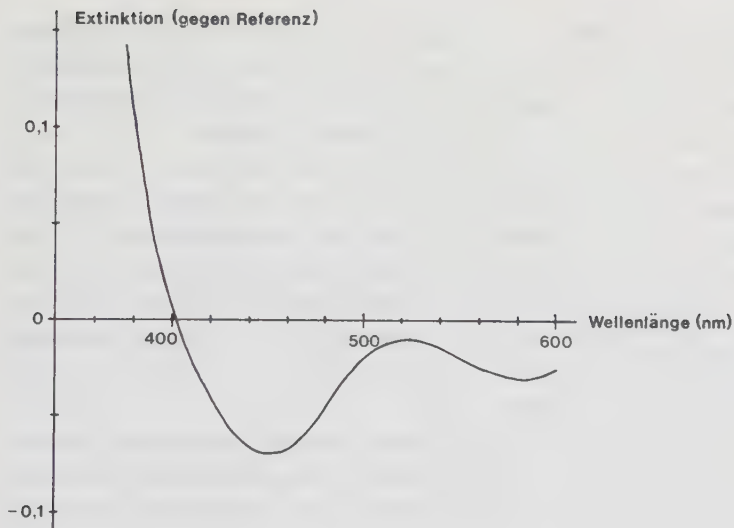


Abb. 14: Spektrum einer Lösung von Azohistidin nach langsamem Eintropfen von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$   
(zur Messung von Differenzspektren sh. 3.2.2)

Weitere Versuche bewiesen, daß eine rasche Zugabe von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ohne Einspülen von Luft eine relativ gute Stabilität und Reproduzierbarkeit ergab.

Eine mögliche Erklärung geben folgende Überlegungen:

Bei der Zugabe von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  zu der sauren Lösung entweicht  $\text{CO}_2$ . Dieses verdrängt den im Ansatz gelösten Sauerstoff, der nach Sluyterman zur Instabilität der Azohistidinverbindungen beiträgt.

Eine schnelle Zugabe von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  führt offensichtlich zu einer besseren Verdrängung des Sauerstoffs.

Eventuell werden auch durch eine schnellere Zugabe von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  bestimmte pH-Bereiche schneller durchlaufen, in denen instabile Zwischenprodukte (durch Kupplung entweder an anderen Atomen des Imidazolringes oder mit Produkten aus der Dediazonierung von Diazobenzolsulfonsäure) entstehen können, die später eine Instabilität des Differenzspektrums verursachen (s.a. 3.2.4.2).

3) Die Zugabe von Ethanol, wie sie bereits von Sluyterman (53) angegeben wird, hatte in den durchgeführten Versuchen einen weiteren stabilisierenden Effekt. Es wurde 20%iges Ethanol verwendet.

Die Ursache für diese Wirkung des Ethanols ist nicht bekannt. Es könnte jedoch diskutiert werden, daß ein ähnlicher Mechanismus wie derjenige zugrundeliegt, der auch bei den Versuchen von McPherson & White (35) (Überführung der Kupplungsprodukte in organische Lösungsmittel) für die Erhöhung der Stabilität verantwortlich war.

4) Da diese Maßnahmen nicht zu befriedigenden Ergebnissen führten, wurden weitere Parameter des Versuchsablaufs variiert bzw. ihre Konstanz zu verbessern versucht.

- \* Bei der Herstellung der Diazoniumverbindung wurde die Geschwindigkeit der  $\text{NaNO}_2$ -Zugabe peinlich genau konstant gehalten.
- \* Die Diazotierungszeit wurde variiert und die Stabilität der Diazoniumverbindung gemessen (sh. 3.2.3.1).
- \* Frische und Zusammensetzung der Reagentien wurden kontrolliert.
- \* Die Kupplungszeit (nach Zugabe von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) wurde von zwei Minuten bis zu mehreren Tagen verändert.
- \* Die verwendeten Lösungen wurden entgast.
- \* Der pH bei der Kupplung wurde durch Verwendung anderer Puffer (Natriumcitrat, Natriumacetat, TRAP/EDTA) zwischen 4 und 10 variiert, was zu geringerer Absorption der Lösung, nicht aber zu erhöhter Stabilität führte.
- \* Menge und Konzentration des zugegebenen  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  sowie die Geschwindigkeit der Zugabe wurden verändert.
- \* Menge und Konzentration des Ethanol wurden variiert.

- \* Statt 20%igen Ethanol's wurde 20%iges Methanol verwendet
- \* Der Einfluß von Lichteinfall und Temperatur bei der Lagerung wurde untersucht.

Lichtausschluß und Lagerung bei 4°C brachten eine geringfügige Verbesserung der Stabilität.

Der pH bei der Messung der Spektren hatte keinen wesentlichen Einfluß auf deren Form, solange er bei der Messung nicht wesentlich unter 10 lag.

Eine befriedigende Stabilität der Spektren über mehrere Tage und eine reproduzierbare Zusammensetzung der Reaktionslösungen konnte jedoch durch keine der aufgeführten Maßnahmen erreicht werden.

Auch die Verwendung von Diazobenzolsulfonamid brachte keine Verbesserung der Ergebnisse.

#### 3.2.3.5 Zusammenfassung der Versuche mit diazotierter Sulfanilsäure

Es gelang nicht, mit Hilfe des verwendeten Verfahrens der Kupplung von Diazobenzolsulfonsäure mit N-Acetylhistidin eine Azofarbstofflösung von befriedigender Stabilität und genügend reproduzierbarer Zusammensetzung herzustellen.

Dafür sind vermutlich zur Hauptsache zwei Faktoren verantwortlich zu machen:

Zum einen führen Dediazonierungsvorgänge zum Auftreten neuer Kupplungspartner. Die dabei entstehenden Verbindungen stören die Messung des Spektrums von Azohistidin.

Zum anderen entstehen - bedingt durch schwer kontrollierbare Faktoren wie Menge der bei der Diazotierung von Sulfanilsäure entstehenden Diazobenzolsulfonsäure<sup>1)</sup>, Sauerstoffgehalt der Lösungen und dadurch, daß die pH-Änderung in der Lösung bei Zugabe von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  nicht konstant und homogen vor sich geht - nicht konstant zu haltende Versuchsbedingungen.

Sie führen vermutlich dazu, daß die Diazobenzolsulfonsäure an verschiedenen Atomen des Imidazolringes des N-Acetylhistidins kuppelt. So entstehen zusätzlich Mono- und Bisazoverbindungen des N-Acetylhistidins in unterschiedlichem Verhältnis und von unterschiedlicher Struktur, die durch ihre verschiedenen Absorptionseigenschaften das entstehende Spektrum entsprechend verändern.

Da im Hauptversuch der Einbau der Azogruppe in das Enzym photometrisch bestimmt werden sollte, war es notwendig, die verschiedenen Azoverbindungen, die dabei entstehen können, photometrisch unterscheiden und quantitativ nachweisen zu können.

Für die spätere Isolierung von Peptiden, die Azohistidin enthielten, mußten zudem die Verbindungen zuverlässig ein stabiles Absorptionsspektrum besitzen und durften durch die Aufarbeitung des Proteins nicht zerstört werden.

Diese Anforderungen erfüllten die mit den bisherigen Verfahren entstehenden Azohistidinverbindungen nicht.

Deshalb wurde versucht, mit einer anderen Diazoniumverbindung und weiteren Modifizierungen des Kupplungsverfahrens stabile Azohistidinverbindungen herzustellen.

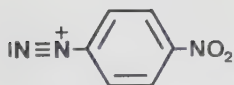
-----  
1) Anmerkung: Nicht die gesamte Menge an eingesetzter Sulfanilsäure reagiert zu Diazobenzolsulfonsäure, da ein Teil des bei der Diazotierung umgesetzten Stickstoffs als  $\text{N}_2$  bzw. in Form von nitrosen Gasen entweicht.

### 3.2.4 Kupplung von Aminosäuren mit diazotiertem p-Nitroanilin

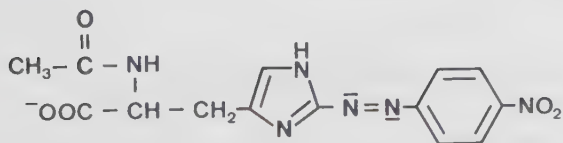
Die Verwendung von p-Nitroanilin zur Diazotierung versprach bessere Resultate. Die Nitrogruppe in para-Stellung erhöht die Stabilität der entstehenden Diazoniumverbindungen (61) sowie die Kupplungsgeschwindigkeit um Faktor 100 (51,62).

#### 3.2.4.1 Kupplungsprodukte mit N-Acetylhistidin, -tyrosin und -cystein

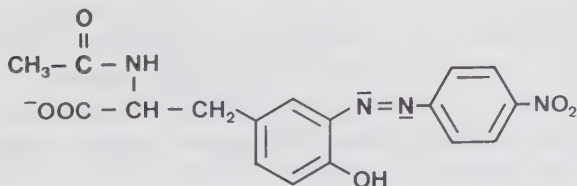
Abb. 15



**p-Nitrodiazobenzol**



**2-Mono-(p-nitroazobenzol)-α-N-acetylhistidin**

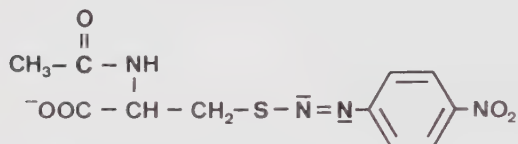


**3-Mono-(p-nitroazobenzol)-α-N-acetyltyrosin**

Abb. 15 zeigt diazotiertes p-Nitroanilin und die mit den Aminosäurederivaten N-Acetylhistidin, und N-Acetyltyrosin entstehenden Monoazoverbindungen. Abb. 16 zeigt p-Nitroazobenzol- $\alpha$ -N-acetylcystein. Die mit N-Acetylhistidin und N-Acetyltyrosin ebenfalls entstehenden Bisazoverbindungen bilden sich analog zu Abb. 5 und Abb. 6.

Diese Verbindungen sollen im Folgenden kurz mit **Mono-** bzw. **Bisazohistidin/tyrosin** bzw. mit **Azocystein** angesprochen werden.

Abb.16



**p-Nitroazobenzol- $\alpha$ -N-acetylcystein**

### 3.2.4.2 Kupplung mit N-Acetylhistidin

#### 3.2.4.2.1 Verbesserung der Stabilität, Ergebnisse

Durch Abändern der von Sluyterman (53) angegebenen Versuchsbedingungen gelang es, den mit N-Acetylhistidin entstehenden Farbstoff zu stabilisieren. Zunächst wurde statt  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1,15 M Kaliumcarbonatpuffer verwendet, da sich diese Salze in höheren Konzentrationen lösen lassen und so ein geringerer Sauerstoffgehalt der Lösung erreicht werden kann.

Die Kupplung wurde durch Zugabe der Diazoniumsalzlösung zu einer Lösung von N-Acetylhistidin in 1,15 M Kaliumcarbonatpuffer eingeleitet. Dies ergab noch keine befriedigende Stabilität.

Die Stabilität der Lösungen wurde dann durch Messung der Spektren bei verschiedenem pH kontrolliert. Bei pH 4 (Essigsäure/Natriumacetat-Puffer) und bei pH 10 (Kaliumcarbonatpuffer 2,3 M) blieb das Spektrum über 30 min. konstant. Nach zwei Tagen war nur noch das Spektrum bei pH 4 erhalten, während der Ansatz bei pH 10 weitgehend verblaßt war.

Abb. 17 zeigt das Spektrum dieses Ansatzes in Kaliumcarbonatpuffer kurz nach Beendigung des Versuchs (Kurve 1) und zwei Tage später (Kurve 2).

Bei pH 6 und pH 8 war die Farbe bereits nach wenigen Minuten verschwunden.

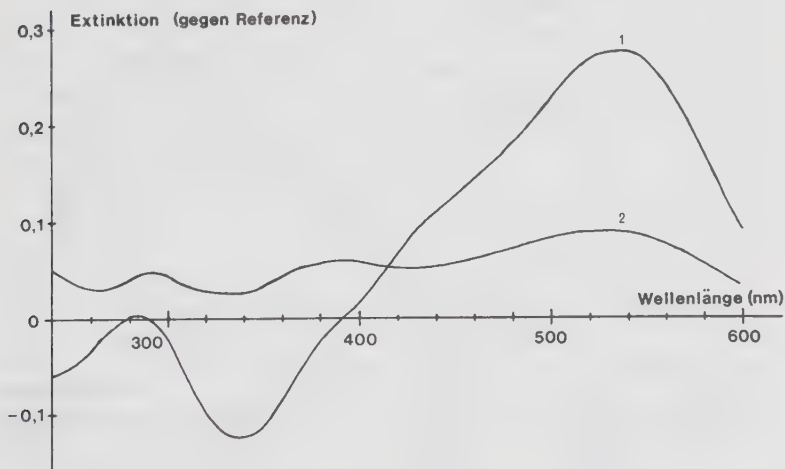


Abb. 17: Spektren einer Lösung von p-Nitroazobenzol-N-acetylhistidin bei pH = 10

(1) sofort nach Versuchsende

(2) 2 Tage später

Als nach Ablauf der gewünschten Kupplungszeit (2 - 10 min. üblicherweise) die Lösung stark angesäuert wurde, und gleich anschließend wieder bis zum Erreichen von pH 10 alkalisiert wurde, blieb das so erhaltene Spektrum (Abb. 18) stabil. Der Zeitverlauf dieses Versuchsablaufs ist unkritisch.

Abb. 18 zeigt die Spektren einer entsprechend hergestellten Lösung 2 min. nach Zugabe der Diazoniumsalzlösung (Kurve 1) und nach Zugabe von HCl, Kaliumcarbonatpuffer und NaOH (Kurve 2). Nachdem die Lösung eine Stunde lang mit Luft durchperlt worden war, wurde wiederum ein Spektrum gemessen. Dieses und eine weitere Messung nach sechs Tagen zeigten keine Änderung gegenüber Spektrum (2).

Die Farbe der Lösung ist im alkalischen Bereich je nach Konzentration rötlich-violett bis fast schwarz und im sauren Bereich hell- bis tiefrot. Bei sehr stark verdünnten Lösungen wurde auch nur eine leichte Gelbtönung beobachtet.

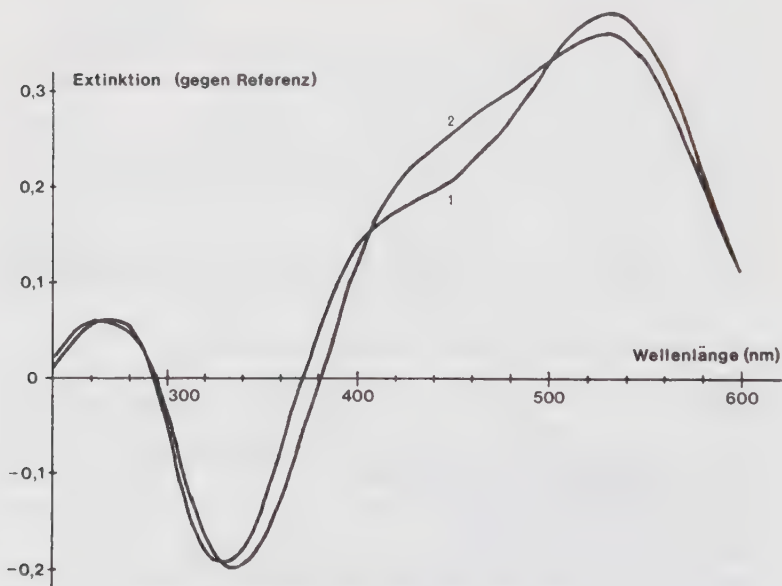


Abb. 18: Spektrum einer Azohistidinlösung in Kaliumcarbonatpuffer  
(1) 1 min. nach Zugabe der p-Nitrodiazobenzollösung (Verhältnis 10 : 1)  
(2) nach Ansäuern und anschließendem Realkalisieren (sh. Text)

Die Spektren von Lösungen, die nach diesem Verfahren hergestellt worden waren, waren in jedem Versuch reproduzierbar. Die Versuchsergebnisse zeigten keine der bisher von verschiedenen Autoren (16,27) beschriebenen Schwankungen, die auch bei den eigenen Versuchen mit Diazobenzolsulfonsäure beobachtet worden waren (sh. Abschnitt 3.2.3.3).

Allerdings zeigte sich bei Versuchen mit **geringerem Überschuß** des Diazoniumsalzes über N-Acetylhistidin keine ganz befriedigende Stabilität. Bei einem Verhältnis der Substanzen von 1 : 1 nahm im Verlauf einiger Tage die Extinktion der Lösung im Bereich um 380 nm (Wellenlänge zur Messung von **Monoazohistidin**, sh. 3.2.4.2.4) sowie um 530 nm (Messung von **Bisazohistidin**) ab. Abb. 19 zeigt den zeitlichen Verlauf der Absorptionen für Kupplungszeiten von 2 min. und 15 min.

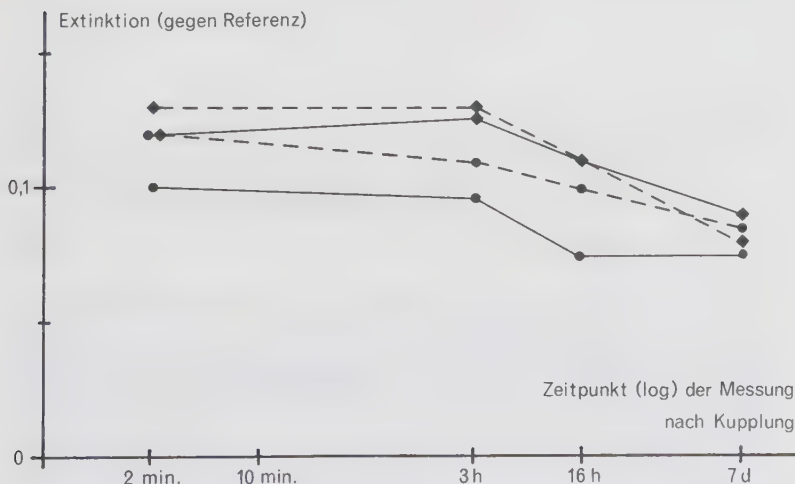


Abb. 19: Zeitlicher Verlauf der Absorption einer Azohistidinlösung (p-Nitrodiazobenzol : N-Acetylhistidin = 1 : 1)  
für 380 nm --- : Messung von Monoazohistidin und  
für 530 nm — : Messung von Bisazohistidin  
Kupplungszeit: 2 min. (●) bzw. 15 min. (◆)

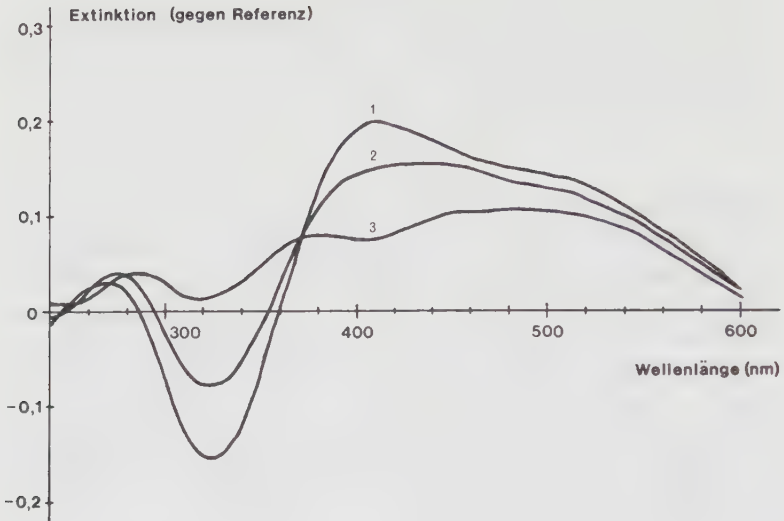


Abb. 20: Änderung des Spektrums einer Lösung von Azohistidin (p-Nitrodiazobenzol : N-Acetylhistidin = 1 : 1) im Verlauf von 16 Stunden (2) bzw. 7 Tagen (3) im Vergleich zum Spektrum sofort nach Beendigung des Versuchs (1)

Kupplungszeit 15 min.

Die Kupplungszeit ist dabei vor allem für den Bereich um 380 nm von Bedeutung, wie Abb. 20 zeigt. Auffällig ist in dieser Abbildung (**Kupplungszeit 15 min.**) der Rückgang der Extinktion um 410 nm im Verlauf mehrerer Stunden. Es muß vermutet werden, daß während der längeren Dauer der Diazokupplung in diesem Versuch Verbindungen geringer Beständigkeit entstanden waren, deren Absorptionsmaxima im Bereich um 400 nm liegen. Darauf wird unter 3.2.4.2.3 und 3.2.4.2.6 noch näher eingegangen werden.

### 3.2.4.2.2 Einfluß der Kupplungszeit

Zur Ermittlung einer sinnvollen Kupplungszeit wurden aus einem Ansatz, der p-Nitrodiazobenzol und N-Acetylhistidin enthielt, zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen, und nach der angegebenen Vorschrift weiterverarbeitet. Die Spektren dieser Proben wurden registriert.

Den Verlauf der Extinktionen bei 380 nm und 530 nm für verschiedene Kupplungszeiten zeigt Abb. 21. Die Versuche wurden mit verschiedenen Mengen an Diazoniumsalz bei gleichen Mengen an N-Acetylhistidin durchgeführt.

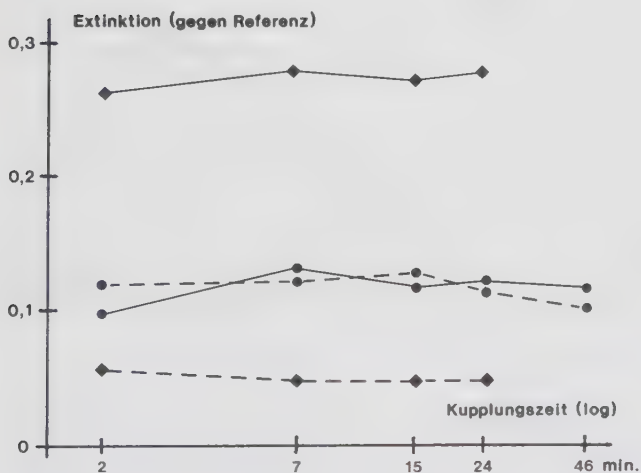


Abb. 21: Einfluß der Kupplungszeit auf das Differenzspektrum von Azohistidinlösungen:

--- Absorption bei 380 nm (Monoazohistidin)

— Absorption bei 530 nm (Bisazohistidin)

p-Nitrodiazobenzol : N-Acetylhistidin = 1 : 1 (●)

10 : 1 (◆)

Die Extinktionsdifferenz zwischen Probe und Referenz erreichte bei Kupplungszeiten von 2 min. bereits 90 % des Maximalwertes, so daß eine Kupplungszeit von 5 min. für die Modellversuche als ausreichend angesehen werden kann.

Bei geringerem Überschuß an Diazoniumionen sind längere Kupplungszeiten um 10 min. sinnvoll.

Es fiel auf, daß in Ansätzen mit höherem Überschuß der Diazoniumsalzlösung (10 : 1) bei längerer Kupplungszeit die Extinktionsdifferenz zwischen 380 nm und 420 nm deutlich zurückging (Abb. 22).

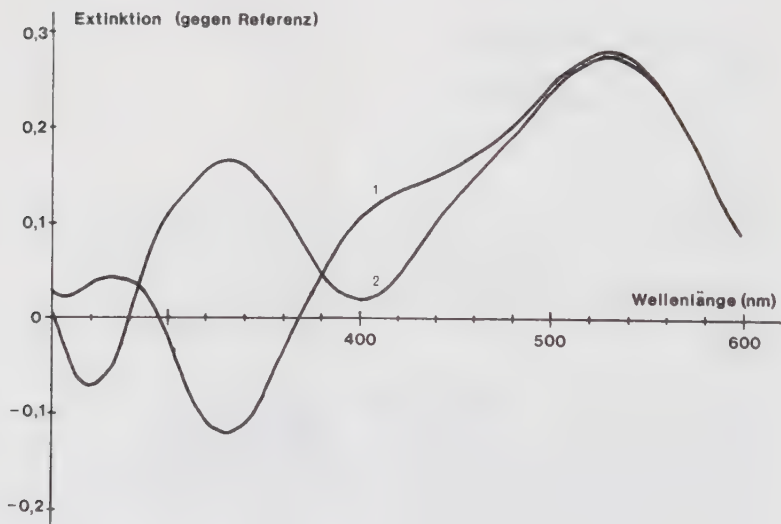


Abb. 22: Spektrum einer Azohistidinlösung bei einer Kupplungszeit von (1) 7 min.  
(2) 15 min.  
(Diazoniumsalz : N-Acetylhistidin = 10 : 1)

Dieser Rückgang während der Kupplungszeit deutet auf den Zerfall von Verbindungen hin, die in diesem Wellenlängenbereich absorbieren. Im Bereich um 350 nm wurde zur gleichen Zeit die vorher negative Extinktionsdifferenz zwischen Probe und Referenz positiv (sh. Abb. 22), was mit dem Gelbwerden beider Lösungen einherging.

Die zunächst negative Extinktionsdifferenz zwischen Probe und Referenz ist darauf zurückzuführen, daß anfänglich in der Referenz mehr der bei diesen Wellenlängen absorbierenden Substanzen vorhanden sind als in der Probenlösung. Im Verlauf von ca. 10 min. finden offenbar in beiden Lösungen Reaktionen statt (Dediazonierung, erneute Kupplung mit den entstehenden Produkten, Kupplung von p-Nitrodiazobenzol mit nicht diazotiertem p-Nitroanilin), die zu einer Zunahme der Extinktionen in diesem Bereich führen. Die gleichzeitige Gelbfärbung der Lösungen ist bereits von verschiedenen Autoren (sh. Abschnitt 3.1.3) beschrieben worden und wurde auch in den eigenen Versuchen mit Diazobenzolsulfonsäure beobachtet. Es muß nochmals erwähnt werden, daß dies Veränderungen während der Kupplungsphase sind, die durch die beschriebene Zugabe von HCl weitgehend unterbrochen werden. Darauf wurde unter 3.2.4.2.1 bereits eingegangen.

#### 3.2.4.2.3 Absolutspektren von Probe und Referenz

Abb. 23 zeigt Spektren von Probe und Referenz jeweils gegen  $H_2O$  gemessen. Man erkennt ein deutliches Absorptionsmaximum bei 530 nm in der N-acetylhistidin-haltigen Probe, sowie ein Absorptionsmaximum bei 340 nm in der Referenz, das evtl. von Kupplungsprodukten des Diazoniumsalzes mit bei Dediazonierungsreaktionen entstandenen Derivaten des p-Nitrodiazobenzol stammen könnte.

Es ist anzunehmen, daß sich das Maximum der N-Acetylhistidin enthaltenden Probe bei 370 nm aus einer Absorptionsbande bei 340 nm (analog zur Referenz) und einer Bande bei ca. 400 nm zusammensetzt, die mehreren Azohistidinverbindungen zuzuschreiben ist.

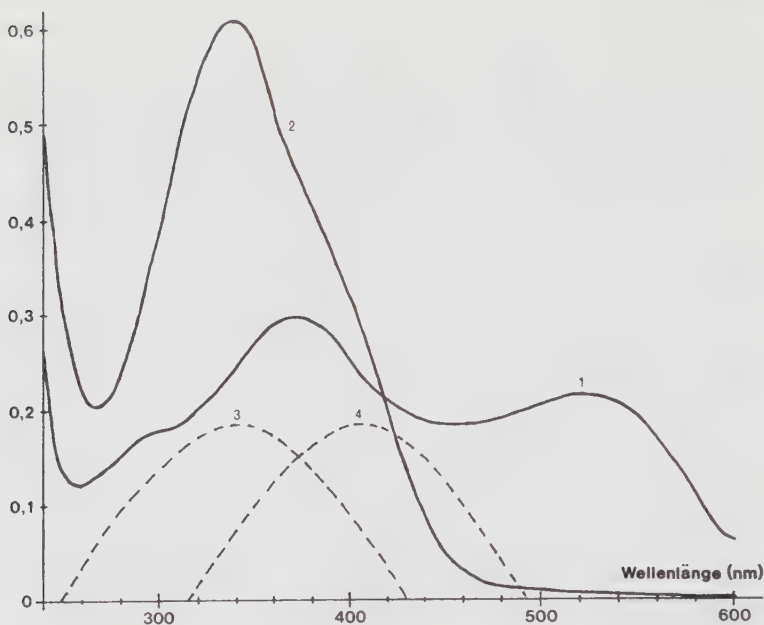


Abb. 23: **Absolutspektren** einer Lösung von Azohistidin (1) sowie der Referenzlösung (2) gegen Wasser; mit unterbrochenen Linien skizziert ist der mögliche Verlauf einer Störbande durch Nebenprodukte (3) sowie der vermuteten eigentlichen Absorption einer Azohistidinverbindung (4) in der Probenlösung.

Die Spektren dieser Abbildung wurden in einem Ansatz mit höheren Konzentrationen der Reaktanden gewonnen (sh. Kapitel Methoden).

(Diazoniumsalz : N-Acetylhistidin = 2 : 1)

Diese vermuteten Absorptionsbanden sind in Abb. 23 mit unterbrochenen Linien angedeutet.

Möglicherweise stellt das längerwellige dieser beiden Maxima bereits die Absorptionsbande einer stabilen Monoazohistidinverbindung dar. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß weitere unbeständige Kupplungsprodukte zur Absorption im Bereich über 400 nm beitragen. Die Differenz der in Abb. 23 gezeigten Absolutspektren entspricht den bereits beschriebenen Spektren anderer Ansätze.

#### 3.2.4.2.4 Variation des Überschusses an Diazoniumsalz

Das Verhältnis von entstehendem **Mono-** bzw. **Bisazo-**histidin in Abhängigkeit vom **Verhältnis** des Diazoniumsalzes zum eingesetzten N-Acetylhistidin wurde durch eine Versuchsreihe untersucht (Abb. 24).

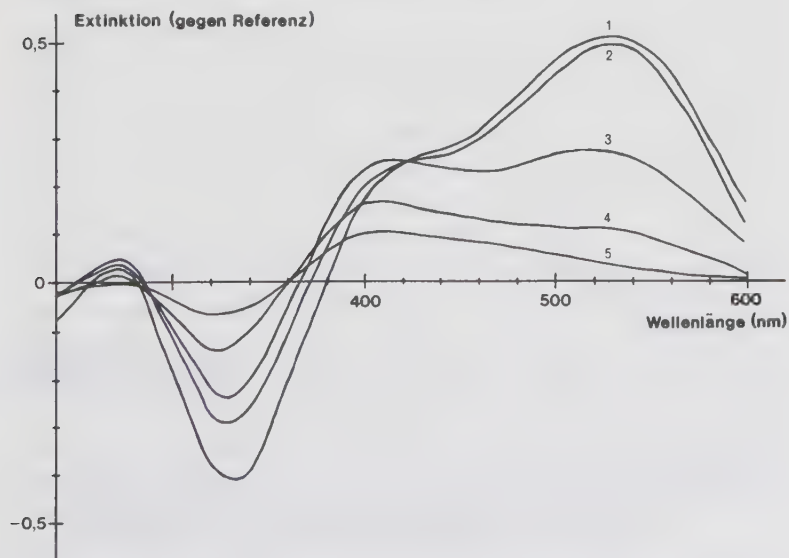


Abb. 24: Spektren von Azohistidinlösungen in Abhängigkeit vom Verhältnis p-Nitrodiazobenzol : N-Acetylhistidin von:

(1) 10 : 1  
(4) 1 : 1

(2) 5 : 1  
(5) 0,5 : 1

(3) 2 : 1

Abb. 24 zeigt die Spektren, die in Ansätzen mit gleichen N-Acetylhistidin-Mengen durch Zugabe verschiedener Mengen der Diazoniumverbindung erzielt wurden. Hier zeigt sich deutlich der später zu diskutierende Einfluß der Diazoniumsalzkonzentration auf die Extinktion bei 350 nm.

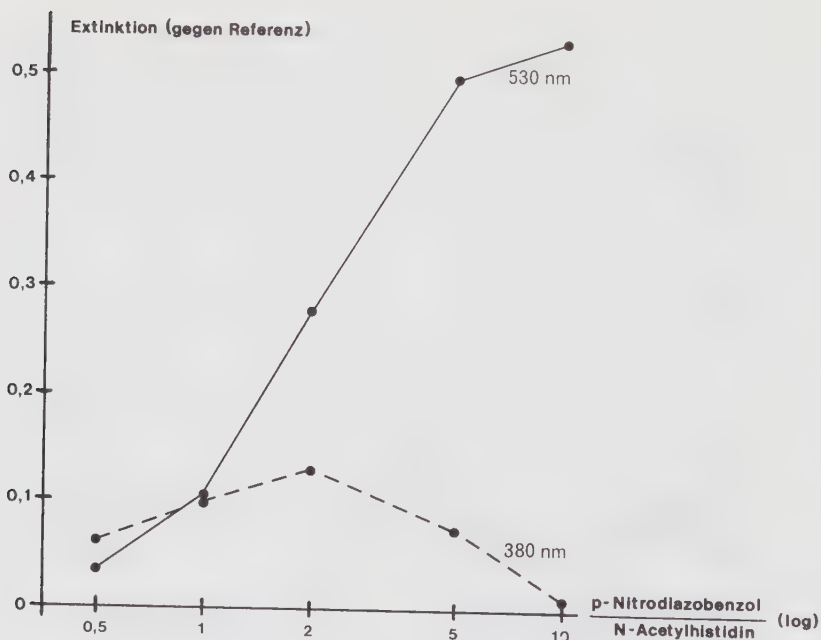


Abb. 25: Abhängigkeit der Absorption (Differenzspektren) von Azohistidinlösungen bei 380 nm — — — bzw. 530 nm — vom Verhältnis p-Nitrodiazobenzol : N-Acetylhistidin

Abb. 25 zeigt die Abhängigkeit der Extinktion dieser Lösungen für zwei Wellenlängen (380 und 530 nm), die als günstig für die Messung von Mono- bzw. Bisazohistidin angesehen wurden.

Für 530 nm zeigt sich für ein Verhältnis Diazoniumsalz : N-Acetylhistidin  $> 1$  ein deutlicher Anstieg der Absorption, der auf die vorwiegende Bildung von **Bisazohistidin** unter diesen Bedingungen zurückzuführen ist.

Eine weitere Fortsetzung dieser Versuchsreihe hin zu höherem Überschuß an Diazoniumionen war mit dem gleichen Ansatz nicht möglich, da dann die Pufferkapazität der N-Acetylhistidin-lösung nicht ausreichte, um die Säureäquivalente der eingebrachten Diazoniumsalzlösung abzupuffern. Weitere Untersuchungen in dieser Richtung hätten außerhalb des Rahmens dieser Arbeit gelegen.

Obwohl in Abb. 24 ein zweites Maximum der Absorption bei ca. 410 nm auftritt, wurde in Abb. 25 die Wellenlänge **380 nm** zur Darstellung der Konzentration von **Monoazohistidin** in der Lösung gewählt, da bei dieser Wellenlänge andere Verbindungen (Bisazohistidin und Nebenprodukte) die Messung nur geringfügig stören. Aus Abb. 25 geht hervor, daß Monoazohistidin bei einem Verhältnis des p-Nitrodiazobenzol zu N-Acetylhistidin von 2 : 1 in maximaler Konzentration gebildet wird, wie dies nach (23,24) zu erwarten ist.

Die genauen Spektren der Mono- und Bisazoverbindungen lassen sich allein durch die Messung der Differenzspektren, wie sie in diesen Versuchen durchgeführt wurden, nicht bestimmen.

Dies wird durch die Überlappung der Absorptionsspektren von Mono- und Bisazohistidin oberhalb von 400 nm und durch das Vorhandensein weiterer unbekannter Reaktionsprodukte in unterschiedlicher Konzentration unmöglich gemacht (s.a Abschn. 3.2.4.2.6).

Es war geplant, bei der Modifizierung des Enzyms die entstehenden Azoverbindungen quantitativ zu bestimmen. Dazu sollten die molaren Extinktionskoeffizienten von Mono- und Bisazohistidin anhand der isolierten Verbindungen bestimmt werden (sh. Abschn. 3.2.4.5).

#### 3.2.4.2.5 Einfluß der Konzentration von Diazoniumsalz

Bei der Modifizierung der GDH ist die Konzentration des umzusetzenden Imidazolrestes und damit die Menge der notwendigen Diazoniumverbindung in der Enzymlösung deutlich kleiner als in den Vorversuchen. Daher wurde auch der Einfluß der Konzentration der Diazoniumverbindung in der Kupplungslösung auf das Verhältnis der entstehenden Mono- und Bisazoverbindungen untersucht.

Dazu wurden gleiche Mengen N-Acetylhistidin in verschiedenen Volumina des Kaliumcarbonatpuffers verdünnt. Es wurde jeweils die gleiche Menge der Diazoniumverbindung zugegeben, so daß das Verhältnis des Diazoniumsalzes zu N-Acetylhistidin immer konstant blieb. Die Konzentration der Reaktionspartner in dieser Versuchsreihe war in den einzelnen Ansätzen jedoch unterschiedlich.

Nach Ablauf der Kupplungszeit wurden die Lösungen mit  $H_2O$  auf das gleiche Volumen aufgefüllt und wie beschrieben angesäuert und wieder alkalisiert.

Die gemessenen Spektren unterscheiden sich nicht wesentlich von denen der Abb. 24, jedoch steigt die Extinktionsdifferenz bei 530 nm mit steigender Konzentration der Diazoniumverbindung an. Abb. 26 zeigt die Extinktionen bei den Wellenlängen 380 nm und 530 nm in Abhängigkeit von der Diazoniumsalzkonzentration in der Kupplungslösung. Das Verhältnis von N-Acetylhistidin zur Diazoniumverbindung war dabei **konstant**.

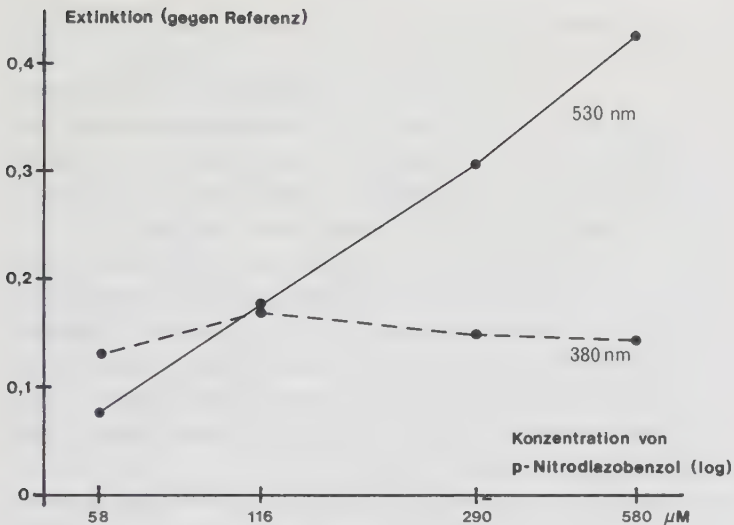


Abb. 26: Abhängigkeit der Absorption von Azohistidinlösungen (gemessen in Differenzspektren) bei 380 nm (— — —) bzw. bei 530 nm (— — —) in Abhängigkeit von der p-Nitrodiazobenzolkonzentration bei der Kupplung. Verhältnis der Diazoniumverbindung zu N-Acetylhistidin konstant gleich 2 : 1

Dieser unerwartete Anstieg der Extinktion bei 530 nm läßt sich möglicherweise so erklären:

Wenn Diazoniumsalz in stärkerer Verdünnung schneller zerfällt (67), so steht weniger davon für die Kupplung zur Verfügung, so daß nicht alles eingesetzte Histidin kuppeln kann.

Dadurch verringert sich bei geringerer Konzentration der Diazoniumionen deren Überschuß über N-Acetylhistidin, wodurch weniger Bisazohistidin (Absorption bei 530 nm) entsteht.

Eine experimentelle Bestätigung dieser Überlegungen steht jedoch aus. Die Fortsetzung der Versuchsreihe mit höheren Konzentrationen scheiterte an der zu geringen Löslichkeit der Kupplungsprodukte.

#### 3.2.4.2.6 Diskussion

Die beschriebenen Experimente zeigen, daß es möglich ist, die bei der Kupplung von N-Acetylhistidin mit p-Nitrodiazobenzol entstehenden Verbindungen in einen stabilen Zustand zu überführen. Mögliche Mechanismen sollen in diesem Abschnitt diskutiert werden.

Durch verschiedene Verhältnisse der Reaktanden entstehen Mono- und Bisazoverbindungen in unterschiedlicher Menge. Die Kupplungszeit hat einen gewissen Einfluß auf die Spektren der Lösungen. Die Differenzspektren der Lösungen und ihre Stabilität sind in einem nicht erwarteten Ausmaß von der **Konzentration** der Reaktanden abhängig.

Nach Beendigung des Versuchsablaufs trat eine geringe Restinstabilität auf, die durch das beschriebene Verfahren nicht beeinflußbar war. Mögliche Ursachen für die beobachteten Abweichungen der Ergebnisse von der Erwartung sollen im Folgenden aufgeführt werden.

Die experimentelle Bestätigung dieser Vermutungen wäre jedoch über den Rahmen dieser Arbeit hinausgegangen und steht daher noch aus.

Wie in den theoretischen Überlegungen erörtert, kommen verschiedene Mechanismen als Ursache für die bekannte Instabilität von Azoverbindungen des Histidins in Betracht. Dies sind die Dediazonierung des diazotierten p-Nitroanilins, die Kupplung von Diazoniumionen mit den entstehenden Verbindungen, der Zerfall bzw. die Umlagerung von Kupplungsprodukten und Reaktionen der dabei entstehenden Verbindungen mit anderen Reaktionspartnern.

1) Reaktionen der **diazotierten** Verbindungen sind vor allem verantwortlich für die Änderungen des Spektrums während der Kupplungsphase.

Es ist anzunehmen, daß diese Vorgänge, die nach (67) z.T. autokatalytisch ablaufen können, in der Referenz verstärkt auftreten, da durch den dort fehlenden Kupplungspartner mehr freies p-Nitrodiazobenzol vorhanden ist.

Wird die in dieser Arbeit angegebene Methode bei Kupplungszeiten von maximal 5 - 8 min. angewandt, so kommen diese Veränderungen erst bei größerem Überschuß von Diazoniumsalz : N-Acetylhistidin (5 : 1 bis 10 : 1) zum Tragen:

Im Bereich von 400 nm verändert sich die Absorption der Proben- und der Referenzlösung durch das Auftreten und Anwachsen einer Absorptionsbande bei 340 nm (sh. Abb. 21 und 22). Dadurch wird die exakte photometrische Bestimmung von Monoazohistidinverbindungen anhand eines Differenzspektrums stark erschwert, da deren Absorptionsmaximum vermutlich zwischen 350 nm und 400 nm liegt.

Die Absorption bei höheren Wellenlängen wird dadurch jedoch kaum beeinflusst.

Die angegebene Methode vermeidet das Auftreten weiterer Instabilitäten nach Abschluß der Kupplungsphase. (Wie oben beschrieben, trifft dies jedoch für Lösungen mit **geringem** Überschuß an p-Nitrodiazobenzol nur eingeschränkt zu, siehe unten.)

Mögliche Ursachen für die beobachtete Änderung der Differenzspektren über die Zeit könnten darin zu suchen sein, daß mit N-Acetylhistidin verschiedene Kupplungsprodukte entstehen können.

Prinzipiell ist eine Kupplung an jedem Atom des Imidazolringes (mit Ausnahme des C<sub>4</sub>-Atoms) möglich (sh. Abb. 3, 5 und 15).

Es scheint nun so zu sein, daß **Monoazoverbindungen** (und unter diesen, wie im theoretischen Teil dargelegt, vor allem die **Diazoaminoverbindungen**) instabiler als die **Bisazoverbindungen** sind.

Untermauert wird diese Überlegung durch Messungen von Fraser et. al. (24), nach denen der zweite Kupplungsschritt bei der Entstehung der Bisazoverbindungen schneller als der erste Schritt abläuft.

Unter den Monoazoverbindungen sind vermutlich Kupplungen an bestimmten Atomen (z.B. am  $C_2$ -Atom) stabiler als andere.

Gleiches gilt auch für Bisazoverbindungen, bei denen gleichfalls anzunehmen ist, daß bestimmte Konstellationen der Kupplung stabiler sind als andere.

Möglicherweise führt nun die angegebene Methode durch die Änderungen des pH zu intramolekularen **Umlagerungen**. Es ist denkbar, daß instabile Verbindungen (z.B. Diazoaminoverbindungen, (44,46)) im sauren Milieu zerstört werden, bzw. instabile Bindungen aufgebrochen werden (so daß aus einer instabilen Bisazoverbindung eine etwas stabilere Monoazoverbindung entstünde).

Weiter könnten die Änderungen des pH auch zur Übertragung von Azogruppen von einem Molekül auf ein zweites führen, so daß aus zwei Monoazoverbindungen eine Bisazoverbindung entstehen könnte.

Solche hypothetischen intra- oder intermolekularen Wanderungen geladener Gruppen sind in unpolaren Lösungsmitteln, wie sie von Edlbacher et al. (16) verwendet wurden, wesentlich schwerer möglich. So könnte der Erfolg der von diesem Autor angegebenen Methode erklärt werden.

Die hier beschriebene Methode führt möglicherweise (durch die auftretenden pH-Änderungen) zu **definierten** Umlagerungen solcher funktioneller Gruppen, wodurch stabilere Verbindungen entstehen können.

Wahrscheinlich greift dieses Verfahren damit näher an der (bisher unbekannten) Ursache der Instabilität von Azohistidinverbindungen an als das von Sluyterman (53) angegebene.

Daraus erklärt sich, daß die hier angegebene Methode die Stabilität der Kupplungsprodukte beträchtlich erhöht.

2) Bei Proben mit **geringem** Überschuß der Diazoniumverbindung (hoher Anteil an **Monoazohistidin**) ist jedoch im Verlauf mehrerer Tage gleichfalls eine Abnahme der Extinktionsdifferenz im Bereich um 400 nm beobachtbar. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Beobachtungen tritt dies erst nach Abschluß des Verfahrens auf (sh. Abb. 19 und 20). Diese Veränderungen werden durch das angegebene Verfahren offensichtlich kaum beeinflusst. Die Absorption bei größeren Wellenlängen ändert sich nur geringfügig.

Das Auftreten einer neuen Absorptionsbande (oberhalb von 250 nm) wurde in Zusammenhang mit diesem Rückgang der Extinktionsdifferenz nicht beobachtet (abgesehen von dem beschriebenen Anwachsen der Extinktionsdifferenz bei 340 bis 350 nm, das von Nebenprodukten und deren Zerfall vor allem in der Referenzlösung bedingt sein dürfte).

Vor allem bei geringem Überschuß an Diazoniumionen und bei längeren Kupplungszeiten (sh. Abb. 20) entstehen bei der Kupplung auch Verbindungen, die sich durch Ansäuern und darauffolgendes Alkalisieren nicht in stabile Produkte überführen lassen. Die Bildung dieser Verbindungen scheint abhängig zu sein vom Überschuß an Diazoniumsalz und auch von der Konzentration der Reaktionspartner.

Diese Parameter beeinflussen den Reaktionsablauf eventuell in der Art, daß bei der Kupplung andere Ringatome zur Bindung kommen und somit **instabile** Mono- und Bisazoverbindungen entstehen.

Durch den Zerfall solcher Verbindungen wäre die Extinktionsabnahme im gesamten Wellenlängenbereich, wie sie in Abb. 19 und 20 deutlich wird, erklärbar.

Diese Abnahme der Extinktionsdifferenzen könnte sicher auch auf Veränderungen in der Referenz zurückgeführt werden, jedoch ist es wahrscheinlicher, daß diese Effekte auf den vermuteten Mechanismen beruhen.

Warum diese Mechanismen bei hohem Anteil an Monoazohistidin stärker zum Tragen kommen, bleibt der endgültigen experimentellen Klärung überlassen, auf die hier zunächst verzichtet werden mußte.

Abschließend seien noch zwei systematische Fehlerquellen aufgeführt, die zu den beobachteten Abweichungen beitragen könnten:

\* Die Diazoniumsalzkonzentration ist von Versuch zu Versuch unterschiedlich (bei der Diazotierung zerfällt ein Teil der entstehenden Ionen sofort zu Stickstoff und dem entsprechenden Hydroxid), was nicht leicht zu vermeiden ist (68).

\* Durch die bei der manuellen Zugabe von Säure und Lauge am Ende der Kupplungsphase nicht genau kontrollierbare pH-Änderung, die nicht an allen Orten der Lösung in gleicher Weise abläuft, gehen die vermuteten Umlagerungen unterschiedlich vor sich. Auch dadurch kann eine unterschiedliche Beständigkeit der Probenlösungen verursacht sein.

Hier könnte die Verwendung von entsprechenden automatisierten Verfahren (z. B. Ionenaustauschersäulen, evtl. auch Festphasenkopplung des N-Acetylhistidins oder Verwendung von pH-Gradienten-Mischern) das Ergebnis verbessern, weil dadurch der Protonierungsgrad der Reaktanden besser gesteuert werden könnte.

Die Fortführung dieser Experimente muß zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen.

Für die Modifizierung der GDH mit Hilfe von diazotiertem p-Nitroanilin war es im Rahmen dieser Arbeit vor allem wichtig, die bisher ungenügende Stabilität der Azohistidinverbindungen verbessern zu können. Trotz der beschriebenen Unzulänglichkeiten war die Beständigkeit der entstehenden Azoverbindungen so gut, daß nach der Modifizierung der GDH eine mehrere Tage dauernde Aufarbeitung des Proteins ohne merkliche Verluste der Farbintensität möglich war.

Das beschriebene Verfahren ist zudem leicht anwendbar und greift vermutlich nahe an der Ursache der Instabilität der Azohistidinverbindungen an.



### 3.2.4.3 Kupplung mit N-Acetyltyrosin

Die Kupplung mit N-Acetyltyrosin wurde analog zur Kupplung mit N-Acetylhistidin durchgeführt. Wie in Abb. 15 gezeigt, kuppelt die Diazoniumgruppe in ortho-Stellung, wobei 3-Mono- bzw. 3,5-Bis(p-nitroazobenzol)-N-Acetyltyrosin entsteht, das hier kurz als Mono- bzw. Bisazotyrosin angesprochen werden soll.

#### 3.2.4.3.1 Stabilität der gemessenen Spektren

Die gemessenen Differenzspektren zeigt Abb. 27. Wieder wurde eine starke Beeinflussung der Messung durch die Absorption der Lösungen bei 340 nm beobachtet, daher war die Schulter bzw. das Maximum um 360 nm sehr variabel.

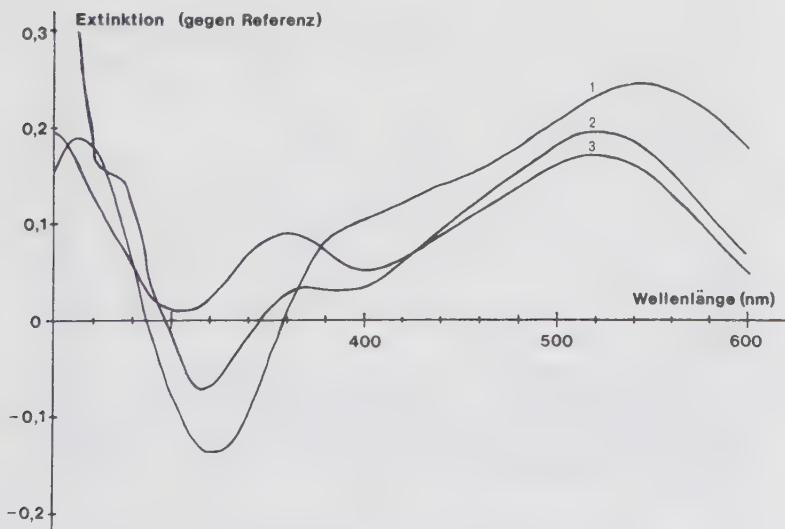


Abb. 27: Spektren von Azotyrosinlösungen bei einem Verhältnis p-Nitrodiazobenzol : N-Acetyltyrosin von

(1) 10 : 1

(2) 1 : 1

(3) 0,25 : 1

Diese störende Absorptionbande konnte durch vorsichtiges Mischen verringert werden. Dennoch gelang es nicht immer, die Spektren zu reproduzieren.

Wie Tab. 1 (S.33) zeigt, werden von verschiedenen Autoren für Azotyrosinverbindungen Maxima bei 320 - 330 nm sowie über 480 nm angegeben. Burkhard et al. (11) beobachteten wie erwähnt in Absorptionsspektren von Azotyrosin zusätzlich eine Schulter bei 390 nm. Dennoch kann aufgrund der Absorption der Nebenprodukte bei 340 nm das in Kurve (3) der Abb. 27 auftretende relative Maximum der Extinktionsdifferenz bei 360 nm nicht zweifelsfrei dem Spektrum einer bestimmten Azotyrosinverbindung zugeordnet werden, da es auch durch einen Überlagerungseffekt zustandegekommen sein kann.

In die Überlegungen der folgenden Abschnitte werden die Absorptionsdifferenzen dieses Wellenlängenbereichs unter Vorbehalt mit einbezogen, da Informationen über Absorptionen der Azotyrosinverbindungen im kürzeren Wellenlängenbereich nur nach der Isolierung dieser Verbindungen gewonnen werden können.

Für die Form der Differenzspektren der Azotyrosinlösungen könnte wie bei Histidin die Konzentration der Diazoniumverbindung von Bedeutung sein; dies wurde jedoch nicht untersucht, da die Frage angesichts der anderen auftretenden Meßungenauigkeit von untergeordneter Bedeutung war.

In Übereinstimmung mit Tab. 1 läßt sich für Azoverbindungen mit Tyrosin ein Absorptionsmaximum bei 520 nm annehmen. Welcher Verbindung es zuzuordnen ist, kann noch nicht entschieden werden.

### 3.2.4.3.2 Unterscheidung zwischen Mono- und Bisazo-tyrosin

Die Unterscheidung zwischen Mono- und Bisazoverbindungen des Tyrosins im Spektrum wird zusätzlich erschwert, da für beide Verbindungen in der Literatur zwei relative Absorptionsmaxima angegeben werden, die sich z.T. überlagern (sh. Tab.1, S.33).

Daher geben die folgenden Messungen über die Art der entstehenden Verbindungen nicht soviel Aufschluß wie bei den Versuchen mit N-Acetylhistidin.

In Abb. 28 sind die Extinktionsdifferenzen der Azo-N-Acetyltyrosinlösungen in Abhängigkeit vom Verhältnis des Diazoniumsalzes zum N-Acetyltyrosin dargestellt.

Eingezeichnet ist die Extinktionsdifferenz zwischen Probe und Referenz bei 520 und bei 550 nm.

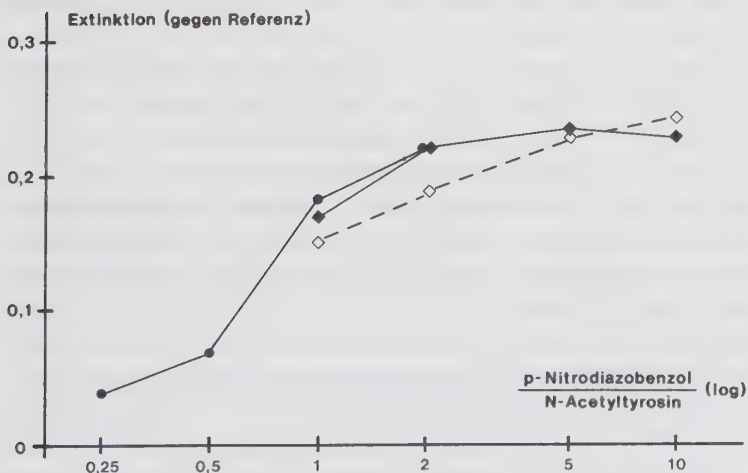


Abb. 28: Extinktion von Azohistidinlösungen in Abhängigkeit vom Verhältnis p-Nitrodiazobenzol zu N-Acetyltyrosin bei 520 nm — bzw. 550 nm — — —  
(Bereich 0,25 : 1 bis 2 : 1 ●  
Bereich 1 : 1 bis 10 : 1 ◆ bzw. ◇ , sh. Text)

Die Werte für geringere Mengen der Diazoniumverbindung wurden bei anderen Konzentrationen der Reaktanden gemessen und sind umgerechnet worden. Daher erklärt sich die leichte Verschiebung. Man erkennt den steilen Anstieg der Extinktion im Bereich 0,5 - 1 (Verhältnis Diazoniumsalz : Tyrosin) und den Beginn der Sättigung bei Verhältnis 5 : 1.

Die offenen Quadrate bezeichnen die Meßwerte bei 550 nm. Der Anstieg der Kurve bei Verhältnissen von 5 : 1 und 10 : 1 über N-Acetyltyrosin läßt vermuten, daß bei größerem Überschuß der Diazoniumverbindung während der Kupplung die Bildung einer Verbindung mit einem relativ langwelligen Absorptionsmaximum zu überwiegen beginnt. Eine Fortführung der Versuchsreihe über dieses Verhältnis hinaus war aus Gründen der ungenügenden Pufferkapazität der N-Acetyltyrosinlösung nicht ohne weiteres möglich. Im Rahmen dieser Arbeit mußte zunächst auf weitere diesbezügliche Versuche verzichtet werden.

Ein weiteres Absorptionsmaximum der Azotyrosinverbindungen ist unterhalb von 400 nm zu erwarten. Die Messungen in diesem Bereich sind jedoch nicht verwertbar, da die Absorption der Nebenprodukte überwiegt.

Die Beziehung zwischen Extinktion und Verhältnis der Reaktanden unterscheidet sich im Bereich zwischen 400 und 500 nm nicht von der in Abb. 28 für 520 nm gezeigten Beziehung.

Die fragliche Bedeutung des Maximums der Extinktionsdifferenz bei 360 nm wurde bereits erläutert.

### 3.2.4.3.3 Zusammenfassung

Die von den Azoverbindungen des Tyrosins gemessenen Spektren erlauben keine direkten Rückschlüsse auf den Anteil der Mono- und Diazoverbindungen in der Lösung, wie dies bei den Versuchen mit Histidin der Fall war, da sich die zu erwartenden Spektren und Absorptionsmaxima der entsprechenden Verbindungen des Tyrosins überlappen dürften, und keine Messungen im Bereich des vermuteten zweiten Maximums möglich waren.

Eine genauere Aussage über die Absorptionsmaxima bzw. das Spektrum von Mono- und Diazozytyrosin kann deshalb nur durch die Isolierung dieser Verbindungen aus dem Reaktionsgemisch erhalten werden.

Eine Dünnschichtchromatographie der Proben zeigte eine Auftrennung in 3 - 4 Banden, die braun gefärbt waren, und nach Bedampfen mit  $\text{NH}_3$  eine violette Tönung bekamen. Sie waren nicht so gut abgrenzbar, daß dieses Verfahren zur Auftrennung der verschiedenen Komponenten geeignet gewesen wäre.

### 3.2.4.4 Kupplung mit N-Acetylcystein

N-Acetylcystein wurde, wie im methodischen Teil beschrieben, mit diazotiertem p-Nitroanilin gekuppelt. Die Formel des zu erwartenden Produktes zeigt Abb. 16 (S.58).

Das Differenzspektrum einer nominell ca. 50  $\mu\text{M}$  Lösung zeigt Abb. 23. Es ist lediglich eine geringe Absorption bei 410 nm meßbar. Entsprechende Ansätze mit N-Acetylhistidin zeigten ca. 10fache Absorptionsdifferenzen.

Von Burkhard et al. (11) wird das Absorptionsmaximum der Azocysteinverbindung von ADP-Derivaten mit 340 nm angegeben. Aufgrund der erwähnten starken Absorption bei dieser Wellenlänge, die in den hier durchgeführten Versuchen in Probe und Referenz auftrat, gelang es hier nicht, eine Absorption in diesem Bereich nachzuweisen. Die Form der gemessenen Spektren unterscheidet sich jedoch in diesem Bereich nicht von den Spektren der Azohistidinverbindungen.

Daher erscheint es unwahrscheinlich, daß bei der Inkubation von N-Acetylcystein mit Diazoniumsalz nennenswerte Mengen einer im Bereich um 340 nm absorbierenden Substanz entstanden sind.

Die Absorption bei 410 nm darf also als alleiniges Kriterium einer erfolgten Kupplungsreaktion bewertet werden, die nur in geringem Umfang stattfand.

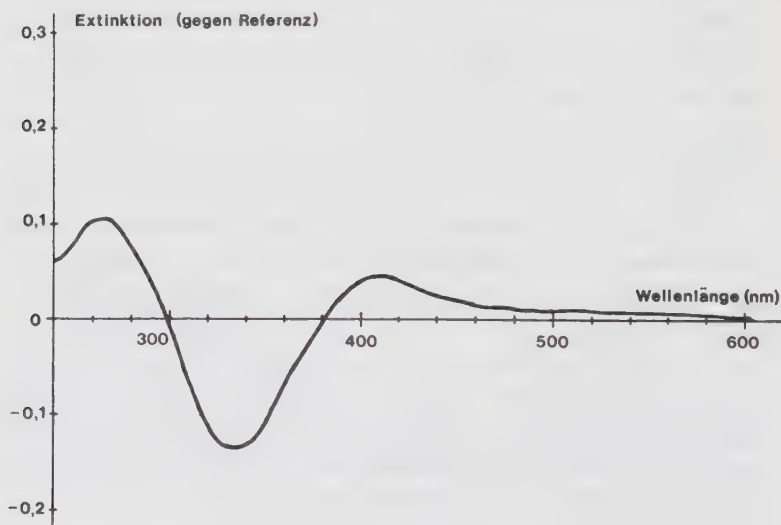


Abb. 29: Reaktion von N-Acetylcystein mit p-Nitrodiazobenzol:  
Spektrum der Reaktionslösung (pH = 10) gegen Referenz

In der Dünnschichtchromatographie trennten sich in der N-Acetylcystein-haltigen Probe und in der Referenz zwei Banden auf, die nahe an der Lösungsmittelfront liefen. Nach Bedampfen mit  $\text{NH}_3$  änderte sich der gelbe Farbton der Bande der N-Acetylcystein-haltigen Probe ins Rötliche, während die Bande der Referenzlösung den gelblichen Farbton behielt.

Weitere Trennungs- und Präparationsversuche mit N-Acetylcystein wurden nicht durchgeführt, da das Hauptinteresse bei dieser Arbeit der Modifizierung des Histidins in der GDH galt.

#### 3.2.4.5 Isolierung der Azohistidinverbindungen

##### 3.2.4.5.1 Synthese

Zur Darstellung der Mono- und Bisazoverbindungen werden 7,5 mmol N-Acetylhistidin mit der doppelten Menge diazotierten p-Nitroanilins gekuppelt. Die verwendete höhere Konzentration in diesem Versuch führt zum Ausfallen eines Teils der Reaktionsprodukte in Form feiner dunkler Flocken, die sich beim nachfolgenden Ansäuern der Suspension wieder lösen.

Dabei schlägt die anfangs braunviolette Farbe ins tiefrote um; der durch das in großer Menge entweichende  $\text{CO}_2$  entstehende Schaum färbt sich gelb. Wird noch weiter angesäuert ( $\text{pH} < 1$ ), fallen rote Teilchen aus, die sich in  $\text{H}_2\text{O}$  lösen lassen. Der Überstand nach dem Ausfällen ist von gelber Farbe. Die Alkalisierung mit NaOH und Kaliumcarbonatpuffer führt wiederum zum Farbumschlag und zum Ausfallen dunkelvioletter Partikel.

Nach Zentrifugieren eines Aliquots dieser Suspension wird der Niederschlag in  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst; Kurve (1) von Abb. 30 zeigt das Spektrum dieser Lösung gegen  $\text{H}_2\text{O}$  mit einem Absorptionsmaximum bei 530 nm.

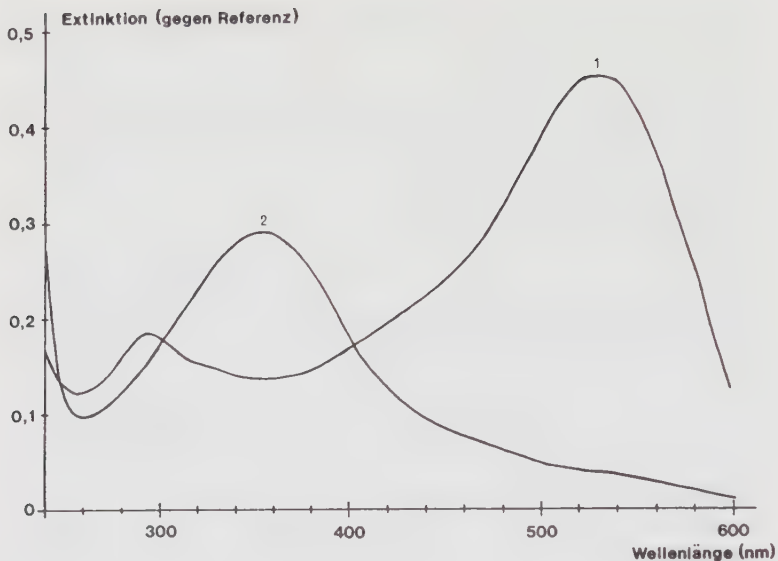


Abb. 30: Spektrum von Azohistidinverbindungen:

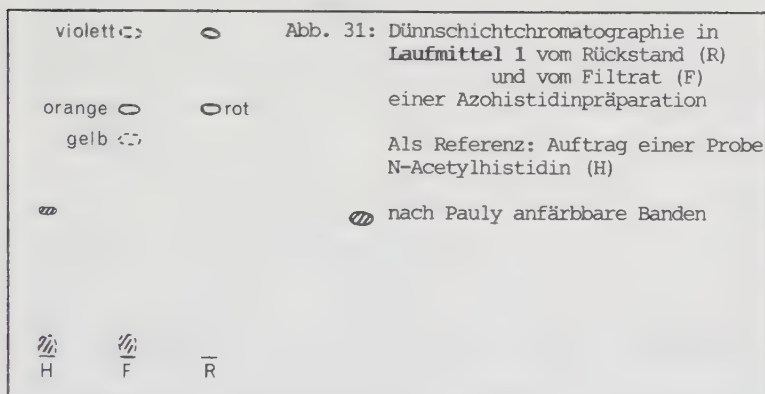
(1) gelöster **Niederschlag**,

(2) **Überstand** (verdünnt) eines stark konzentrierten Ansatzes

Kurve (2) zeigt das Spektrum des verdünnten Überstandes gegen  $H_2O$  mit einem Absorptionsmaximum bei 350 nm. Das Gemisch wird filtriert, und die Rückstände in heißem Wasser gelöst. Beim Erkalten bildet sich eine gallertartige Masse, die nicht kristallisiert, und in  $H_2O$  und Ethanol leicht löslich ist. Sowohl Filtrat (F) als auch Rückstand (R) wurden weiter aufgetrennt.

#### 3.2.4.5.2 Trennung auf Dünnschicht-Kieselgelplatten

In der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-Platten in **Laufmittel 1** trennten sich aus dem verdünnt aufgetragenen **Rückstand (R)** eine starke rote und eine violette Bande auf, die nahe der Lösungsmittelfront liefen (Abb. 31).



Die gleichen Banden erhält man bei der Dünnschichtchromatographie des Filtrates (F), wobei die violett gefärbte, am weitesten laufende Bande wesentlich schwächer war. Zusätzlich tritt eine langsamer laufende gelbe Bande auf.

Zur Kontrolle wird auch N-Acetylhistidin aufgetragen und später mit Pauly-Reagenz nachgewiesen (rote Färbung). Die Bande zeigt ebenfalls Abb. 31. Sie ist nicht mit den anderen Banden identisch.

An den Auftragsstellen von Überstand und N-Acetylhistidinkontrolle bleiben mit Pauly-Reagenz violett anfärbbare Substanzen liegen.

Mit Ausnahme dieser Flecken ist kein unmodifiziertes N-Acetylhistidin nachweisbar.

Die roten Banden, die aus dem gelösten Rückstand abgetrennt worden sind, werden ausgekratzt, der Farbstoff wurde in 25% Ethanol eluiert, und nach Zugabe von Kaliumcarbonatpuffer gegen  $H_2O$  spektralphotometriert (Abb. 32, Kurve (1)).

Neben dem Maximum des Azofarbstoffes bei 535 nm entsteht ein hohes Maximum bei 400 nm (\*), das von gleichfalls eluierten Kieselgel-Bestandteilen (Bindemittel) verursacht wird.

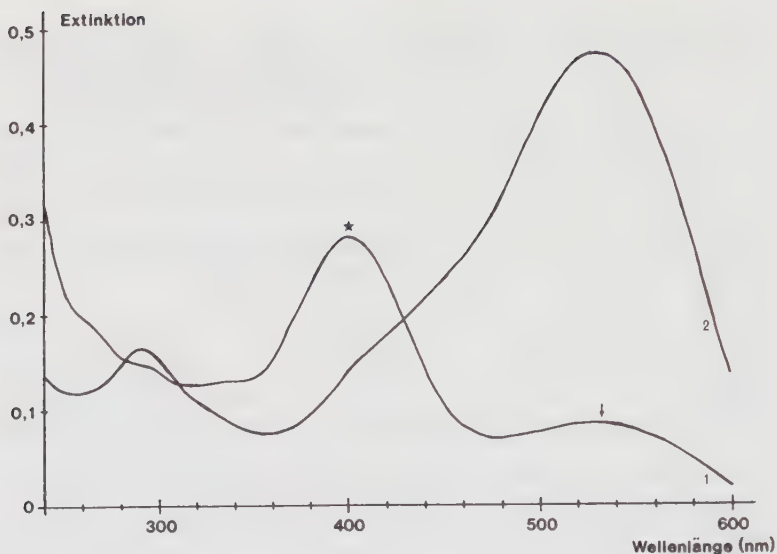


Abb. 32: Dünnschichtchromatographie einer Azohistidinpräparation:  
 (1) Spektrum des Eluates der ausgekratzten **roten** Bande der Abb. 31 (↓ Absorptionsmaximum der Azoverbindung) (\* Absorptionsbande des Bindemittels)  
 bei pH 10 gegen  $H_2O$   
 (2) Spektrum des durch  $HCl$  ausfällbaren Azofarbstoffes in höherer Konzentration (ebenfalls bei pH 10 gegen  $H_2O$ )

Kurve (2) zeigt das Spektrum des durch Ausfällen mit  $HCl$  abtrennbaren Azofarbstoffes in höherer Konzentration. Es weist neben dem absoluten Absorptionsmaximum ein weiteres kleines Maximum bei 290 nm auf.

Im **Laufmittel 3** trennen sich aus dem **Rückstand** eine im sauren Milieu rötliche, eine orange und eine gelbe Bande auf. Weitere 3 Banden waren nur schwach gelblich gefärbt (Abb. 33).

Die drei stärksten Banden dieses Chromatogramms werden in Ethanol eluiert. Im Spektrum (Abb. 34, pH = 10) gegen  $H_2O$  zeigt die gelbe Bande ein Absorptionsmaximum bei 405 nm (1), die orangefarbige Bande ein Maximum bei 535 bis 540 nm (2). Die rötliche Bande weist zwei diskrete Maxima um 400 nm und um 540 nm auf (Kurve (3)).

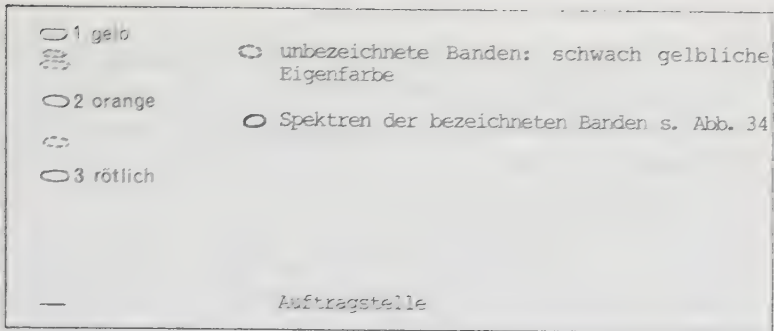


Abb. 33: Dünnschichtchromatographie in Laufmittel 3 vom Rückstand der Azohistidinpräparation

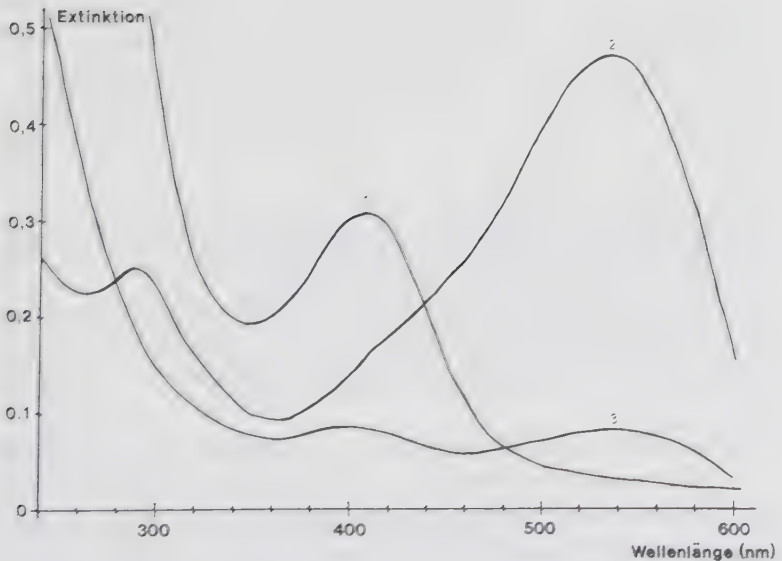


Abb. 34: Spektren der aus dem Chromatogramm der Abb. 33 (Rückstand) eluierten drei stärksten Banden (bei pH 10 gegen  $H_2O$ ): (1) gelbe Bande (2) orangerote Bande (3) rötliche Bande

Bereits beim Ansäuern der verdünnten Lösung des **Rückstandes** fällt ein Teil der gelösten Stoffe aus. Werden diese ausfallenden Stoffe abzentrifugiert, und wieder in größerem Volumen gelöst, so ergibt sich im Spektrum ein Maximum bei 530 nm.

Die Bande (3) der Abb. 33 wurde dann mittels HPLC weiter aufgetrennt. Es konnten zwei Fraktionen isoliert werden, die im sauren Milieu bei ca. 425 nm absorbierten. Ein Absorptionsmaximum bei dieser Wellenlänge entspricht im alkalischen Milieu einem Maximum bei 530 nm. Es trennten sich eine große Anzahl bei 280 nm absorbierender Fraktionen ab.

Dies läßt darauf schließen, daß bei der Dünnschichtchromatographie zahlreiche Substanzen mit kleineren konjugierten Systemen von der mutmaßlichen Azohistidinverbindung nicht abgetrennt und daher mit eluiert worden waren. Sie sind als Umlagerungs- und Zersetzungsprodukte der Diazotierungs- und Kupplungsreaktionen anzusehen.

Da nach Elution der Farbstoffe aus dem Kieselgel nur geringe Mengen davon zur Verfügung standen, war eine weitere Auftrennung zunächst ausgeschlossen.

Daher wurde eine Trennung der Azohistidinverbindungen auf Kieselgel-Säulen versucht, die jedoch zu keinen verwertbaren Ergebnissen führte.

Die **überstehende Lösung** zeigt ein Absorptionsmaximum bei 400 nm. Es dürfte sich bei letzterem im wesentlichen um dieselbe Substanz handeln, die bereits in der Dünnschichtchromatographie des Rückstandes (sh. Abb. 33) als mittlere Bande abgetrennt wurde. Die beiden anderen Banden können den bei der Ansäuerung der Lösung ausfallenden Substanzen zugeordnet werden.

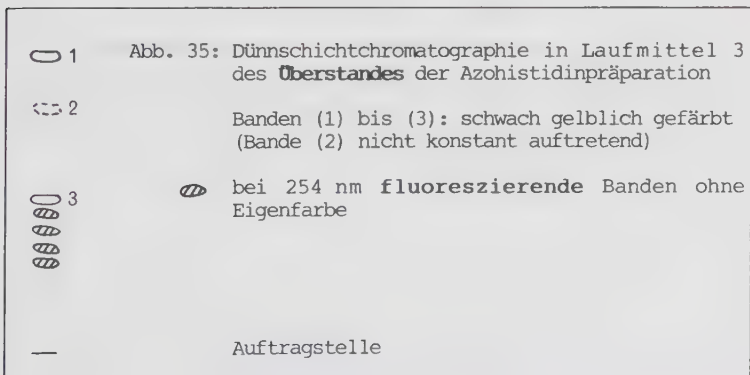
Mit diesem bei der Präparation gewonnenen **Überstand** der Reaktionslösung wurden ebenfalls Dünnschichtchromatographien im **Laufmittel 3** durchgeführt. Die Banden zeigt Abb. 35 (s.a. Abb. 31).

Es trennen sich zwei (z.T. auch drei, sh. Abb. 35) stärker und eine schwächer gelblich gefärbte Bande ab (1 - 3). Vier weitere Banden (schraffiert in Abb. 35) fluoreszieren unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm.

Die im sichtbaren Bereich absorbierenden zwei stärkeren Banden wurden ausgekratzt, eluiert und im Spektralphotometer analysiert (Abb. 36).

Die am weitesten laufende Bande (1) weist ein Absorptionsmaximum bei 405 nm auf und dürfte mit der Bande (1) der Abb. 34 identisch sein.

Die Bande (3) der Abb. 35 zeigt lediglich eine Schulter bei 380 nm in einer zu kürzeren Wellenlängen hin stetig ansteigenden Extinktionskurve (Abb. 36, Kurve (2)).



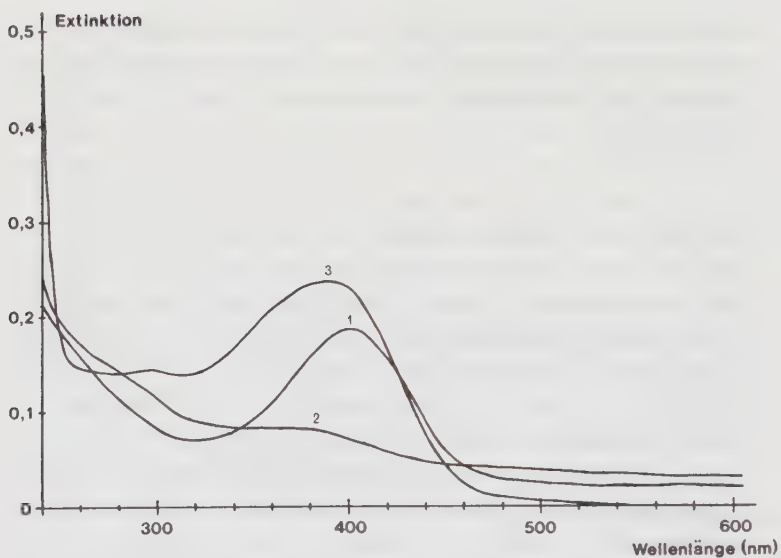


Abb. 36: Spektren des **Überstandes** der Azohistidinpräparation gegen  $H_2O$  bei pH = 10: (3) vor Auftrennung  
(1) Bande (1) der Abb. 35  
(2) Bande (3) der Abb. 35

Ein Spektrum des **Überstandes** vor der Auftrennung durch die Dünnschichtchromatographie (10% Ethanol gegen  $H_2O$ ) zeigt zum Vergleich Kurve (3) der Abb. 36, worin sich ein Maximum der Absorption bei 390 nm darstellt.

### 3.2.4.5.3 Andere Trennverfahren

Um das eigentliche Ziel der Arbeit, die Markierung und Inaktivierung der GDH mit Hilfe von diazotiertem p-Nitroanilin mittels der erarbeiteten Methode in Angriff nehmen zu können, wurde hier darauf verzichtet, die entstandenen Azoverbindungen des N-Acetylhistidins weiter zu isolieren (z.B. Trennung auf Ionenaustauscherharzen, (11)).

Die HPLC, die wohl heutzutage das am meisten versprechende Verfahren zur Auftrennung von Reaktionsprodukten darstellt, stand zu diesem Zeitpunkt routinemäßig nicht zur Verfügung.

Daher wurde, ausgehend von den erhaltenen Ergebnissen, GDH modifiziert und versucht, gefärbte Peptide bzw. modifizierte Aminosäuren zu isolieren und zu identifizieren. Diese Versuche werden im nächsten Abschnitt beschrieben.



### 3.3           Modifizierung der GDH mit p-Nitrodiazobenzol               und Auftrennung der modifizierten Peptide

#### 3.3.1       Plan

Wie bereits ausführlich erläutert, war es das Ziel dieser Arbeit, die Histidinseitenkette, die vermutlich Teil des Aktivitätszentrums der GDH ist, mit Hilfe einer Diazoniumverbindung zu markieren. Dabei sollte eine Mono- (oder Bis-)azohistidinverbindung entstehen. Durch Blockierung der essentiellen Aminosäureseitenketten verliert das Enzym seine katalytische Funktion. Die Aktivität der Enzymlösung geht zurück.

In den Vorversuchen war die salzsaure Diazoniumsalzlösung zur Kupplung zunächst zu einer Lösung von N-Acetylhistidin in Kaliumcarbonatpuffer (pH 10,5) gegeben worden.

Bei diesem pH liegt jedoch die GDH bereits in inaktiver Form vor, so daß mit Hilfe eines Enzymtests keine Aussage über eine mögliche Blockierung des Aktivitätszentrums durch Einführung einer Azogruppe gemacht werden kann. Außerdem ist wegen der zu erwartenden anderen Raumstruktur des Enzyms bei diesem pH nicht sicher, daß die Aminosäuren, die Teil des Aktivitätszentrums sind, spezifisch markiert werden.

Das pH-Optimum der Enzymaktivität der GDH liegt im TRIS-EDTA-Puffer bei pH 7,6 (18). Wird die Aktivität in Natriumpyrophosphatpuffer bei pH 8 getestet, so findet man noch ca. 75% der Aktivität.

Wird die Kupplung bei diesem pH durchgeführt, ist demnach anzunehmen, daß bei der Modifizierung der GDH die Raumstruktur des Enzyms nahezu unverändert vorliegt und somit die dem Aktivitätszentrum angehörigen Aminosäureseitenketten mehr exponiert sind als andere Seitenketten.

Daher werden diese leichter modifiziert als nicht am Aktivitätszentrum beteiligte Aminosäureseitenketten. Erstes Ziel war daher, N-Acetylhistidin mit p-Nitrodiazobenzol bei diesem pH zu kuppeln.

Um sicherzugehen, daß bei der Reaktion mit der Diazoniumverbindung nur die dem Aktivitätszentrum zugehörige Aminosäure modifiziert würde, mußte die zugegebene Menge des Reagenzes relativ klein gewählt werden.

Dadurch werden nur exponierte Teile des Enzyms, wie z.B. das Aktivitätszentrum modifiziert. Andere Aminosäuren als Histidin, die nicht zum Aktivitätszentrum gehören, werden aufgrund ihrer geringeren Kupplungsreaktivität mit geringerer Wahrscheinlichkeit als Histidin markiert. Somit wird durch die Zugabe nur geringer Mengen der Diazoniumverbindung auch die Spezifität des Modifizierungsverfahrens erhöht.

Die Art und Menge der bei der Modifizierung entstehenden Azoaminosäureverbindungen sollte ursprünglich photometrisch bestimmt werden.

Da es nicht gelungen war, die entsprechenden Aminosäuremodellverbindungen rein darzustellen und daher keine Spektren dieser Verbindungen vorlagen, war dies nicht möglich. Der Umfang der Modifizierung konnte nur über die Messung der Aktivitätsminderung des Enzyms bestimmt werden. Es wurde soviel Reagenz zugegeben, daß die Enzymaktivität auf 10 % sank. Dabei wurde in Kauf genommen, daß ein geringer Teil der essentiellen Seitenketten unmodifiziert blieb.

Unter diesen Bedingungen wurde dann eine größere Menge Protein modifiziert und nach Denaturierung mit TCA tryptisch gespalten.

Die entstehenden Peptide sollten aufgetrennt und die gefärbten, d.h. eine markierte Aminosäure tragenden Peptide isoliert werden.

Durch eine Aminosäureanalyse sollte ihr Gehalt an Aminosäuren (mit Ausnahme der modifizierten Aminosäure) bestimmt werden.

Eine direkte Registrierung der markierten Aminosäure ist wie erwähnt nicht möglich, da nach Riordan (48) bei der verwendeten Säurehydrolyse Azohistidin zerstört wird. Welche Abbauprodukte dabei entstehen, ist nicht bekannt. Die Identifizierung modifizierter Aminosäuren eines gefärbten Peptids durch Vergleich mit entsprechenden Modellverbindungen war nicht möglich, da die Azoaminosäureverbindungen nicht rein zur Verfügung standen.

Aus der Summe der in einem Peptid enthaltenen Aminosäuren kann anhand der bekannten Sequenz der GDH (41,42) auf dessen Sequenz geschlossen werden. Damit kann die Lage des Peptids und somit die Position der markierten Aminosäure innerhalb der GDH-Sequenz ermittelt werden.

Dies ist ein Weg, um die eingangs zitierte Hypothese von Otto et al. (42) zu unterstützen oder zu widerlegen, wonach His-94 am katalytischen Vorgang in der GDH wesentlich beteiligt ist.

### 3.3.2      Enzymatischer Test

Die Enzymaktivität wurde im optischen Test nach Warburg bestimmt.

#### 3.3.2.1    Testreaktion, Ermittlung der Enzymaktivität

Bei der Reaktion



die von der GDH katalysiert wird, ist die Abnahme der Konzentration von NADH pro Zeiteinheit ein Maß für die Enzymaktivität der GDH. Die Konzentration des NADH wird anhand seiner Extinktion bei 365 nm bestimmt. Im Schreiberprotokoll kann durch Anlegen einer Tangente an die Extinktionskurve zu Beginn der Reaktion die initiale Extinktionsabnahme pro Zeiteinheit ermittelt und daraus die maximale Enzymaktivität errechnet werden.

Zunächst wurde in TRA-EDTA-Puffer bei pH 7,6 getestet.

#### 3.3.2.2    Enzymatischer Test modifizierter GDH

Die Blockierung des Aktivitätszentrums der GDH durch Reaktion von Aminosäureseitenketten mit p-Nitrodiazobenzol wird durch Vergleichen der Enzymaktivität des modifizierten Enzyms mit der Aktivität nativer GDH ermittelt.

Da die Diazotierung der GDH in Natriumpyrophosphatpuffer stattfindet, wird auch die Enzymaktivität in diesem Puffer getestet. Der pH-Wert des Puffers wurde zu 8,0 gewählt, da bei diesem pH die Pufferkapazität größer als bei pH 7,6 ist. Bei pH 8,0 besitzt die GDH eine noch relativ hohe Aktivität.

In dem im methodischen Teil angegebenen Ansatz wurde in Natriumpyrophosphatpuffer bei pH 8 für frisch dialysierte unveränderte GDH (Konzentration 3,3 mg/ml = 44  $\mu$ M GDH, entsprechend 88  $\mu$ M Untereinheiten) eine spezifische Aktivität von  $9,2 \cdot 10^4$  U/g GDH gefunden.

### 3.3.2.3 Auffälligkeiten beim Test nativer GDH

Beim Testen nativer GDH wurde ein bisher nicht beschriebenes Phänomen beobachtet. Es soll hier kurz dargestellt werden:

Im enzymatischen Test sinkt die Konzentration des Coenzyms NADH exponentiell mit der Zeit ab. In den durchgeführten Versuchen traten Abweichungen von diesem theoretischen Kurvenverlauf auf.

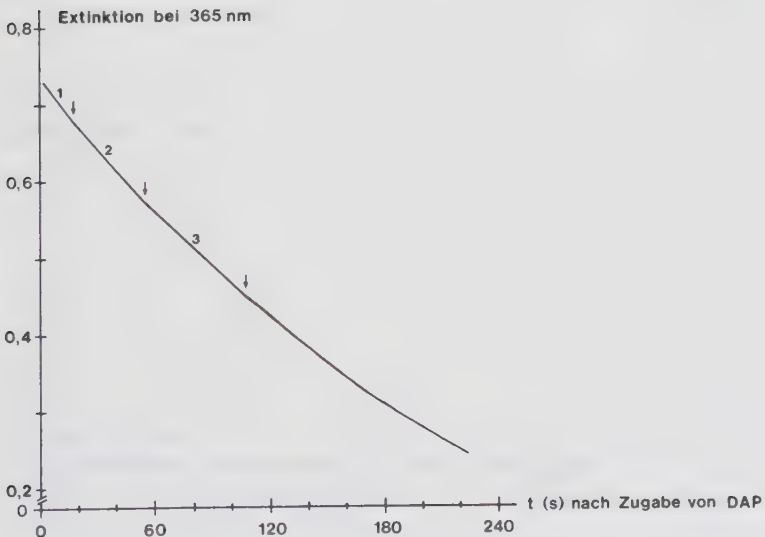


Abb. 37: Schreiberprotokoll eines enzymatischen Tests der GDH  
Die Pfeile weisen auf die beobachteten Knicke im Kurvenverlauf hin, die Zahlen bezeichnen die jeweilige Teilstrecke (sh. Abb. 38)

Abb. 37 zeigt ein typisches Schreiberprotokoll der Extinktion von NADH bei 365 nm. Es zeigt drei deutliche Knicke im Verlauf der Extinktion über die Zeit. Danach nimmt die NADH-Extinktion exponentiell mit der Zeit ab.

In Abb. 38 sind für verschiedene Aktivitäten der Meßlösung die an jeder Teilstrecke gemessenen Aktivitäten dem zeitlichen Ende der jeweiligen Teilstrecke zugeordnet. Die gezeichnete Punktwolke deutet auf eine exponentielle Korrelation der Variablen hin. Dies würde bedeuten, daß bei geringerer Enzymaktivität der Lösung der Abstand der Stufen im Schreiberprotokoll größer würde.

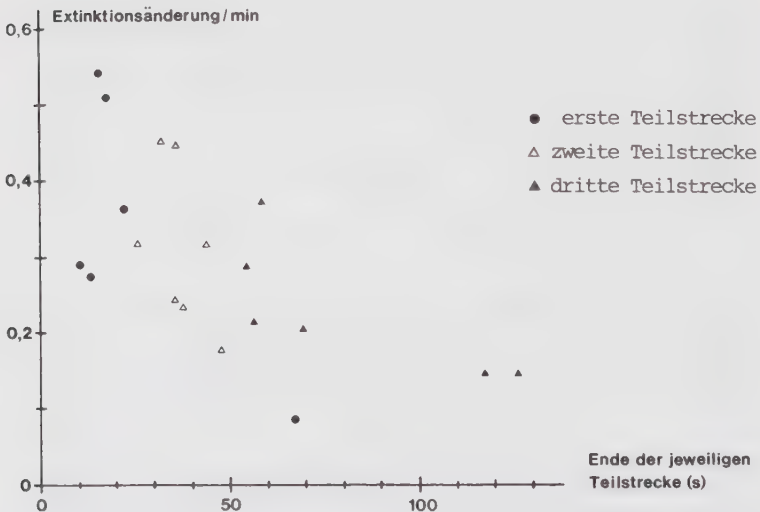


Abb. 38: Zuordnung der zeitlichen Extinktionsänderung jeder Teilstrecke (sh. Abb. 37) zum Zeitpunkt des darauffolgenden Knickes (Pfeil in Abb. 37), für verschiedene Enzymkonzentrationen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte dieses interessante Phänomen nicht weiter untersucht werden. Es wäre denkbar, daß eine Assoziation bzw. Dissoziation von Coenzym bzw. Substrat miteinander bzw. jeweils mit dem Enzym oder entsprechende Reaktionen der Produkte diesen Effekt hervorrufen. Durch weitere Variationen der Versuchsbedingungen (Konzentrationen, pH, Vorinkubation der verschiedenen Reaktionspartner miteinander) wäre dies näher zu untersuchen. Anzeichen deuten darauf hin, daß evtl. Zerfallsprodukte des NADH die beobachteten Knicke unterdrücken können.

### 3.3.3 Durchführung der Modifizierung

#### 3.3.3.1 Kupplung bei pH 8

Zunächst war die Kupplung von N-Acetylhistidin mit p-Nitrodiazobenzol in 1,15 M Kaliumcarbonatpuffer bei pH 10,5 durchgeführt worden.

Wie erwähnt, war es notwendig, die GDH bei pH 8 zu modifizieren, da bei diesem pH die Raumstruktur des Enzyms nahezu unverändert vorliegt. Es wurde daher versucht, die Kupplung von N-Acetylhistidin mit p-Nitrodiazobenzol bei diesem pH durchzuführen.

Dazu wurde N-Acetylhistidin in Natriumpyrophosphatpuffer bei pH 8 auf 290 mM verdünnt, und die Kupplung wie üblich durchgeführt, wobei gleichfalls ein roter Farbstoff entstand (p-Nitrodiazobenzol : N-Acetylhistidin = 2 : 1). Nach Ablauf von 10 min wurde statt wie vorher mit H<sub>2</sub>O mit 1 : 20 verdünntem Kaliumcarbonatpuffer (ca. 0,1 M) verdünnt, wie beschrieben angesäuert und wieder alkalisiert. Ein Spektrum des Ansatzes in Natriumpyrophosphatpuffer (Kurve 1) und nach dem Abschluß der Stabilisierung (Kurve 2) zeigt Abb. 39. Diese Lösung war wie die vorherigen Ansätze in ihrem Spektrum über mehrere Tage stabil.

Dies zeigt, daß auch bei pH 8 eine Kupplung von p-Nitrodiazobenzol mit N-Acetylhistidin stattfindet. Die Produkte dieser Reaktion können durch Ansäuern in Gegenwart von Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und darauffolgendes Alkalisieren wie gewohnt stabilisiert werden.

Zur Modifizierung der GDH wurde das Verfahren wie weiter unten beschrieben soweit geändert, daß nach der Zugabe einer entsprechenden Menge der Diazoniumverbindung zu der in Natriumpyrophosphatpuffer gelösten GDH nach Ablauf der Kupplungszeit ein gleiches Volumen z.B. 2,3 M Kaliumcarbonatpuffers zugegeben wurde und dann wie erläutert angesäuert wurde.

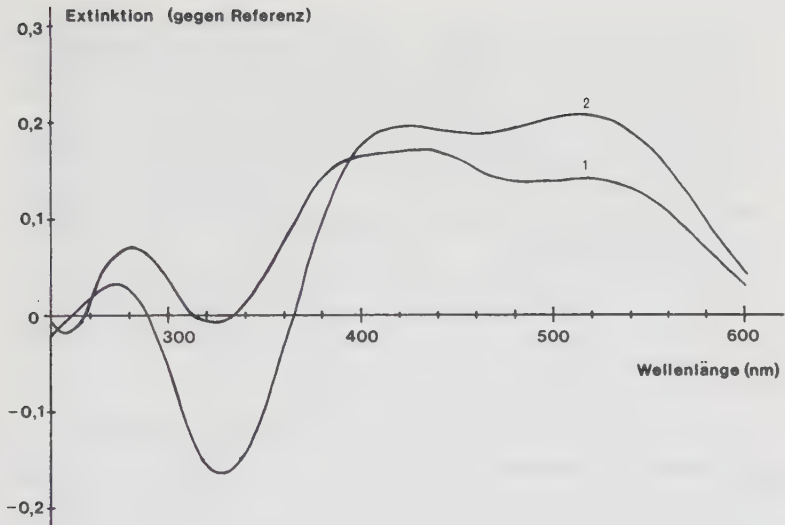


Abb. 39: Diazokupplung mit N-Acetylhistidin bei pH 8:

- (1) Spektrum direkt nach Kupplung (gemessen bei pH = 8)
- (2) Spektrum nach Stabilisierung (gemessen bei pH = 10)

### 3.3.3.2 Blockierung der Enzymaktivität

Zur Kupplung wurde die GDH durch Dialyse gegen Natrium-pyrophosphatpuffer (pH 8) von Ammoniumsulfat gereinigt. p-Nitroanilin wurde wie beschrieben diazotiert und bei 0°C zu der zu modifizierenden Enzymlösung sowie zu einer Referenzlösung, die nur Natrium-pyrophosphatpuffer enthielt, zugegeben. Bereits nach kurzer Zeit entstand in der Enzymlösung eine gelbe Farbe, die sich im weiteren Verlauf nicht wesentlich änderte.

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe der Diazoniumverbindung wurden der Enzymlösung Proben zur Aktivitätsmessung entnommen.

Eine unbehandelte Enzymlösung wurde gleichfalls bei 0°C aufbewahrt und zur gleichen Zeit getestet.

Den Rückgang der Enzymaktivität in %, bezogen auf die Aktivität der Referenzlösung des Enzyms, in Abhängigkeit von der Kupplungszeit zeigt Abb. 40.

Das molare Verhältnis p-Nitrodiazobenzol : UE GDH (Untereinheit) betrug hierbei 1,6 : 1 bzw. 3,9 : 1.

Der Rückgang der Aktivität folgt im wesentlichen einer Exponentialfunktion.

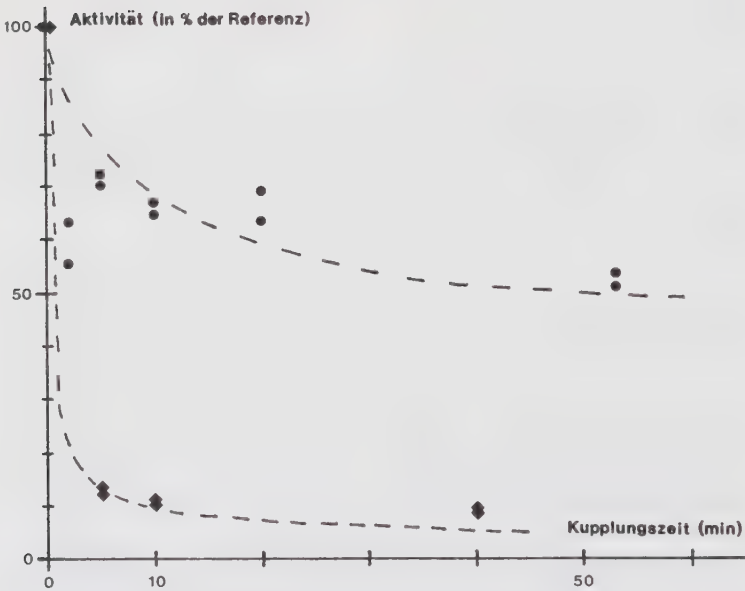


Abb. 40: Verbleibende Enzymaktivität modifizierter GDH (in % der Referenz) in Abhängigkeit von der Dauer der Kupplung mit p-Nitrodiazobenzol

● p-Nitrodiazobenzol : UE GDH = 1,6 : 1

◆ p-Nitrodiazobenzol : UE GDH = 3,9 : 1

In Abb. 41 ist der zeitliche Verlauf der Enzymaktivität in der Referenzlösung sowie nach Zusatz von p-Nitroanilin (3,3 : 1 pro mol UE GDH) zur Enzymlösung dem Rückgang der Aktivität nach Zugabe von p-Nitrodiazobenzol im Verhältnis 3,9 : 1 pro UE GDH (aus Abb. 39) gegenübergestellt.

Die geringfügige Abnahme der Aktivität nach Zugabe von p-Nitroanilin ließe sich evtl. durch die bekannte Bindungsfähigkeit der GDH für Nitrophenolester (Hydrolyseaktivität, (2)) erklären.

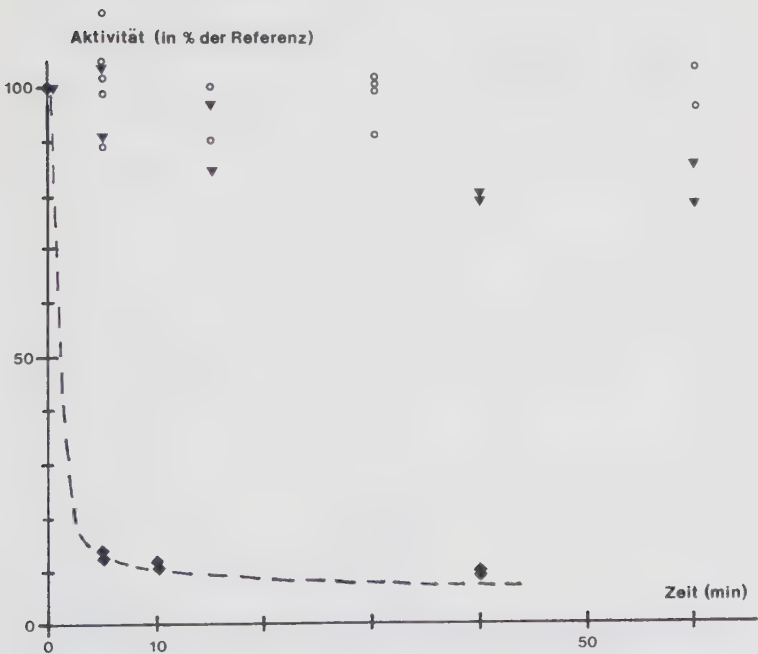


Abb. 41: Zeitlicher Verlauf der Enzymaktivität in der Referenzlösung (o) in % vom Durchschnitt der Ausgangswerte, sowie nach Zusetzen von p-Nitroanilin (▼) im Verhältnis 3,3 : 1 pro mol UE GDH) zum Vergleich: Inaktivierung von GDH durch p-Nitrodiazobenzol (◆) (3,9 : 1 pro mol UE GDH, aus Abb. 39)

$\text{NaNO}_2$  hatte in den verwendeten Konzentrationen keinen meßbaren Einfluß auf die Aktivität. Die Abbildung macht deutlich, daß die beobachtete Aktivitätsminderung nach Zugabe von p-Nitrodiazobenzol auf eine Reaktion dieser Verbindung mit funktionellen Gruppen der GDH beruhen muß.

In Abb. 42 ist die Enzymaktivität gegen die Menge des zugesetzten Diazoniumsalzes pro UE GDH aufgetragen. Als Parameter diente hier die Einwirkungszeit bis zur Messung.

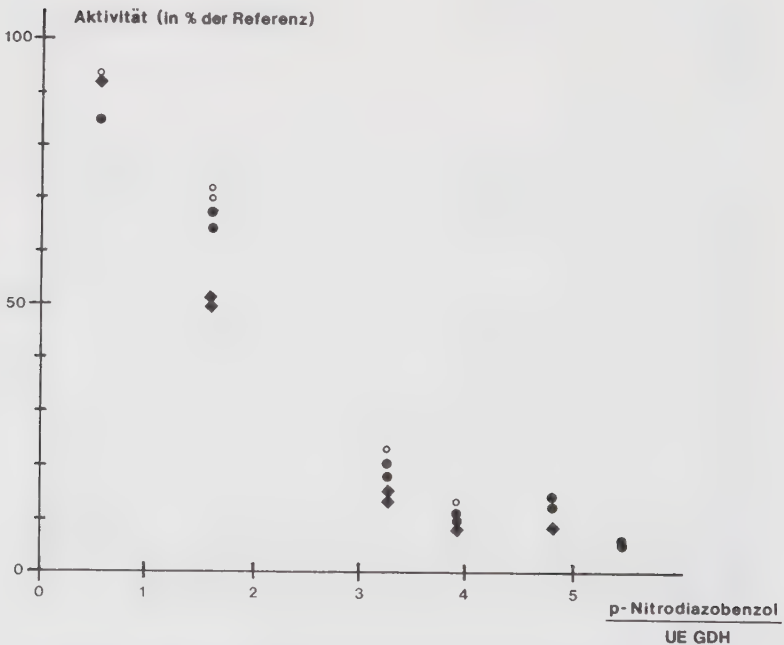


Abb. 42: Abhängigkeit der Inaktivierung der GDH vom Verhältnis  
p-Nitrodiazobenzol : UE GDH  
Kupplungszeit: ○ 5 min.  
● 10 min.  
◆ 40 min.

Aus dieser Abbildung läßt sich abschätzen, wieviel Diazoniumsalz der Enzymlösung zugesetzt werden muß, um eine 90%ige Hemmung der Aktivität zu erreichen. Es ist ersichtlich, daß die Kupplungszeitzeit für das Ausmaß der Inaktivierung eine untergeordnete Rolle spielt.

### 3.3.3.3 Spektren des modifizierten Proteins

Nach 10 min. Kupplungszeit wurde ein Spektrum der Enzymlösung gegen eine Referenz (Natriumpyrophosphatpuffer mit Diazoniumsalz) gemessen. Das Ergebnis zeigt Abb. 43, Kurve (1). Anstatt der erwarteten Absorptionsmaxima bei 530 nm und bei 405 nm findet sich lediglich ein kontinuierlicher Anstieg der Extinktion ab 500 nm mit einer Schulter um 350 nm.

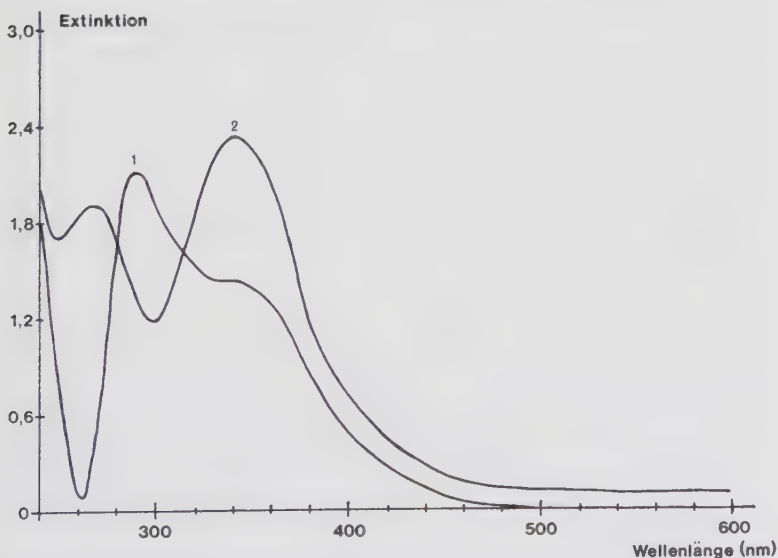


Abb. 43: Spektrum modifizierter GDH (Messung bei pH = 10)  
(1) nach 10 min. Kupplungszeit (gegen Referenz)  
(2) nach Denaturierung, Abtrennen löslicher Substanzen  
und tryptischer Spaltung in AHC (Messung gegen AHC  
bei pH = 8)

Dieser Anstieg ist nicht auf das Vorhandensein von Protein in der Probenlösung zurückzuführen, wie durch Vergleich mit GDH-Spektren deutlich wurde (39).

Diese Beobachtung läßt sich durch Nachbargruppeneffekte im Protein erklären und wird von verschiedenen Autoren (z.B. Riordan et al., (48)) berichtet. Demnach zeigen Azoproteine oft breite überlappende Absorptionsbanden, deren geringe Auflösung die Identifikation der modifizierten Seitenketten stark erschwert.

Sind die Extinktionskoeffizienten der möglichen Azo-Aminosäureverbindungen bekannt, so kann nach Riordan et al. (48) die Art und Menge der entstandenen Azoverbindungen aus dem Spektrum der Enzymlösung berechnet werden. Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht gelungen, die p-Nitroanilin-Azohistidin-Verbindungen rein darzustellen. Die Extinktionskoeffizienten von Mono- bzw. Bisazohistidin und anderer möglicherweise entstehender Kupplungsprodukte waren daher nicht bekannt. Der Gehalt der Enzymlösung an solchen Verbindungen mit den Seitenketten der GDH konnte deshalb nicht - wie zu Beginn beabsichtigt - aus den gemessenen Spektren errechnet werden.

Im Spektrum der Lösung der tryptischen Peptide des modifizierten Proteins (sh. nächster Abschnitt), das in AHC-Puffer bei pH 8 gegen eine Leerprobe gemessen wurde, findet sich ein deutliches Maximum bei 340 nm (siehe Abb. 43, Kurve (2)). Hier ist die Größe der Peptide geringer, so daß die Nachbargruppeneffekte zurücktreten.

Burkhard et al. (11) fanden bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum für Azo-N-Acetylcystein. Wie berichtet konnte unter den hier verwendeten Bedingungen eine Kupplung von p-Nitrodiazobenzol mit N-Acetylcystein nicht nachgewiesen werden.

Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, daß im Versuch mit GDH auch Cystein-Seitenketten mit der Diazoniumverbindung reagiert haben. Nach anderen Literaturstellen (56) absorbiert allerdings die Monoazoverbindung des N-Acetylhistidin mit Diazonium-1H-tetrazol bei 340 nm, so daß ein Absorptionsmaximum anderer Azoverbindungen des Histidins in diesem Bereich nicht unwahrscheinlich ist. Die in den Vorversuchen gemessenen Absorptionsmaxima bei 340 nm, die Nebenprodukten der Kupplungsreaktion zugeschrieben werden müssen, können mit der in Abb. 43 dargestellten Bande nicht übereinstimmen, da dieses Spektrum von denaturiertem, mehrmals gereinigtem Protein gemessen wurde.

### 3.3.4 Präparation modifizierter Peptide

#### 3.3.4.1 Kupplung des Enzyms mit p-Nitrodiazobenzol

Nachdem in den unter 3.3.3 beschriebenen Versuchen ermittelt worden war, wieviel p-Nitrodiazobenzol zur 90 %igen Inhibition der GDH notwendig war (Verhältnis von ca. 5 : 1 pro mol GDH), wurde eine größere Menge des Proteins nach der Reinigung von Ammoniumsulfat in Natriumpyrophosphatpuffer gelöst und mit der entsprechenden Menge p-Nitrodiazobenzol inkubiert.

Nach Ablauf von 10 min. wurde die Lösung mit gleichem Volumen 2,3 M Kaliumcarbonatpuffer und darauffolgend mit HCl versetzt, wie ausführlich im Teil Methoden beschrieben ist. Bei der Zugabe von HCl mußte wegen der starken Schaumbildung durch das entweichende CO<sub>2</sub> sehr vorsichtig vorgegangen werden.

#### 3.3.4.2 Denaturierung und tryptische Spaltung

Danach wurde das modifizierte Protein sowie native GDH mit 5 % TCA gefällt und mit AHC gewaschen. Es wurde kein Farbstoff ausgewaschen, der Überstand über dem gefällten modifizierten Protein war klar und farblos.

Die darauffolgende tryptische Spaltung ging bei einem Teil der modifizierten Ansätze nur zögernd vor sich, so daß eine erheblich längere Spaltungszeit und größere Mengen Trypsin als üblich nötig waren, um das Protein zu spalten.

Das Klarwerden der Proteinsuspension, das das In-Lösung-Gehen der entstehenden Spaltstücke anzeigte, wurde als Kriterium für den Fortgang der tryptischen Spaltung herangezogen. Ca. 10 % des eingesetzten Proteins konnten nicht in Lösung gebracht werden und müssen daher als ungespalten angesehen werden.

Die Lösung der tryptischen Peptide wurde zusammen mit den ungelösten Proteinteilen gefriergetrocknet und danach in geringem Volumen von Ethanol, TFA, oder Dünnschichtchromatographie-Laufmittel gelöst. Die dabei nicht löslichen Anteile des Lyophilisats wurden vor den im Folgenden beschriebenen Versuchen zur Auftrennung der tryptischen Peptide der GDH abzentrifugiert.

#### 3.3.4.3 Trennung der Peptide auf Kieselgelplatten

Es wurde nun versucht, aus den bei der tryptischen Spaltung entstehenden Peptiden dasjenige zu isolieren, das den Azofarbstoff enthielt. Erschwert wurde die Auftrennung der tryptischen Peptide der GDH dadurch, daß die Spaltung offensichtlich wie oben beschrieben nicht vollständig abgelaufen war. Das vermehrt zugegebene Trypsin führte zu einer Verunreinigung der Peptidlösung.

Als Trennverfahren wurden zunächst die Dünnschichtchromatographie und dann die Fingerprinttechnik eingesetzt.

Die Peptide wurden mit Fluorescamin (19,60) (= Fluram<sup>R</sup>) angefärbt und unter UV-Licht von 254 nm und 366 nm markiert. Mit einer nach (3) modifizierten Vorschrift wurden histidin- und tyrosinhaltige Peptide angefärbt und identifiziert.

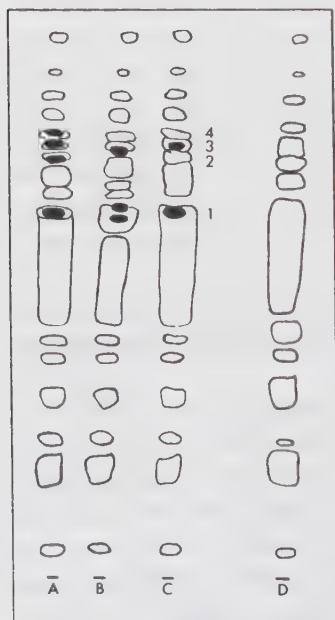
Die Peptidmuster modifizierter GDH wurden mit Chromatogrammen unveränderter, in gleicher Weise präparierter GDH-Peptidlösungen verglichen.

Weitere Versuche zur Auftrennung der Peptide wurden mit Gelfiltration sowie mit HPLC durchgeführt.

In der eindimensionalen Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten trennten sich aus der Lösung tryptischer Peptide modifizierter GDH im Laufmittel 1 zwei bis vier rötlich bis braun gefärbte Flecken ab, die auch jeweils mit Fluram anfärbbar waren.

Allerdings fanden sich an den entsprechenden Stellen des Referenzchromatogrammes unveränderter GDH ebenfalls Peptidflecken (sh. Abb. 44). Wohl aufgrund der unvollständigen Spaltung des Proteins blieb bei diesem Versuch sowie beim nachfolgend beschriebenen Fingerprint ein beträchtlicher Teil des eingesetzten Proteins an der Auftragsstelle liegen.

Die Änderung der Laufeigenschaften des Peptids, die durch die Kupplung des Histidinseitenkette mit der Diazonium-Verbindung bewirkt wurde, reichte wider Erwarten also nicht aus, um in diesem Laufmittel und in diesem Verfahren eine ausreichende Trennung zu erzielen. Durch die bereits diskutierte mögliche Blockierung von Lysin- und auch Arginin-Seitenketten durch Kupplung mit der Diazoverbindung und die dadurch auftretende Hemmung des Trypsins entstanden möglicherweise auch größere gefärbte Peptide.



○ Peptidbande  
● Eigenfarbe

Abb. 44:

Dünnschichtchromatographie von  
tryptischen Peptiden  
modifizierter GDH  
(A - C: verschiedene Ansätze)

sowie unveränderten Enzyms (D).

Aufgetragen wurde nominell  
6 nmol (A) bzw. 4 nmol (B - D).  
Technik sh. Abschnitt Methoden.

Eigenfarbe der Banden:

- (1) gelb, in (A) rötlich
- (2), (4) gelbbraun
- (3) rötlich bis violett

Diese trennten sich aufgrund ihrer Größe nicht von anderen Peptiden ab, obwohl dies durch die Hydrophobie der eingebrachten Azogruppe zu erwarten gewesen wäre. Durch die zweidimensionale Dünnschichtchromatographie in den Laufmitteln 1 und 2 auf Cellulose-Platten war keine bessere Abtrennung der modifizierten von den nicht modifizierten Peptiden der Azo-GDH möglich.

Von weiteren Präparationen unveränderter und modifizierter GDH wurden daher **Fingerprints** angefertigt. Dabei wird nur eine Probe pro Kieselgelplatte aufgetragen. Zunächst wird eine Elektrophorese (hier meist in saurem Medium) durchgeführt. Danach wird die Platte getrocknet und in einem zweiten Laufmittel chromatographiert. So werden gerade schwer trennbare Stoffgemische durch Ausnützen verschiedener physikalischer Eigenschaften leichter getrennt.

Der Vergleich mit früheren Versuchen von Otto mit nativer GDH (43) zeigte eine weitgehende Übereinstimmung der Peptidmuster. Die Auftrennung tryptischer Peptide modifizierter GDH ergab wiederum bis zu drei gefärbte Banden, die in der Elektrophorese auf der Auftragsstelle liegenblieben, aber in der Dünnschichtchromatographie soweit wie in den zuerst durchgeführten Versuchen wanderten (Abb. 45).

Die Anfärbung der Chromatogramme mit Pauly-Reagenz (nach (3)) ergab für die Peptide unveränderter und modifizierter GDH bis zu 12 Pauly-positive (d.h. Histidin oder Tyrosin enthaltende) Flecken.

Um diese histidin- bzw. tyrosinhaltigen Peptide zu identifizieren, wurden auf anderen, nur mit Fluram markierten Chromatogrammen die korrespondierenden Peptidflecken ausgekratzt und die Peptide eluiert.

Gleichfalls ausgekratzt und eluiert wurden alle Stellen mit Eigenfarbe sowie Peptidflecken, die in den Fingerprints unveränderter und modifizierter Ansätze nicht übereinstimmten. Dadurch sollte das Fehlen oder eine Veränderung eines dieser Peptide im Ansatz mit modifizierter GDH nachgewiesen werden.

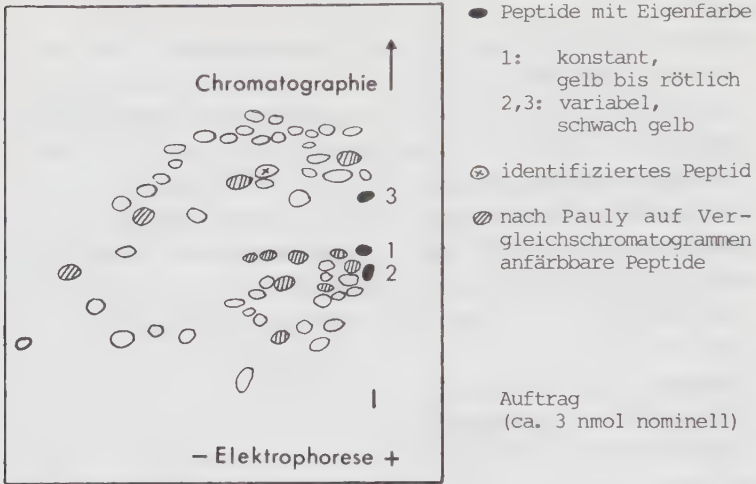


Abb. 45: Fingerprint tryptischer Peptide modifizierter GDH  
(Technik siehe Abschnitt Methoden)

#### 3.3.4.4 Aminosäurenanalyse isolierter Peptide

Eluiert wurde in Ethanol, in Elektrophoresepuffer und Laufmittel 1, sowie in verdünntem  $\text{NH}_3$ . Meist wurden mehrere Elutionsmittel nacheinander mit zwischenzeitlicher Trocknung des Kieselgels verwendet.

Alle eluierten Proben wurden einer Hydrolyse mit 6 M HCl (110°C Vakuum) unterzogen und dann im Aminosäureanalysator analysiert.

Der Nachweis von Azo-Aminosäuren nach HCl-Hydrolyse ist nach Riordan (48) nicht möglich, da Azoverbindungen bei der Säurehydrolyse der Peptidbindungen zerstört werden.

Daher mußte die Identifizierung auch modifizierter Peptide allein anhand der Summe der nicht modifizierten Aminosäuren des Peptids versucht werden.

Nur ein Peptid konnte anhand seiner Aminosäurezusammensetzung durch Vergleich mit der GDH-Sequenz (41,42) eindeutig identifiziert werden (s.a. Abb. 45).

Es enthält kein Histidin und besitzt die Sequenz Leu(296)-Glu-Gly-Pro-Glu-Thr-Ala-Arg(303).

Alle anderen Proben enthielten entweder zu wenig Material oder eine Mischung mehrerer Peptide, so daß eine Zuordnung allein aufgrund der Aminosäurezusammensetzung nicht möglich war.

Die Änderung des pH bei der Elektrophorese von 5 auf 3,5 sowie die Verwendung anderer Laufmittel für die Dünnschichtchromatographie brachten gleichfalls keine bessere Auftrennung.

Schließlich wurde versucht, auf Cellulose-Platten die Elektrophorese im basischen pH-Bereich durchzuführen; die Verwendung von Kieselgelplatten ist wegen der Instabilität des Bindemittels in diesem Bereich nicht möglich. Als flüchtige Puffer wurden N-Äthyl-Morpholin 0,5 M und 0,1 M, mit HCl auf pH 8 eingestellt, und Piperidin 0,1 M, mit HCl auf pH 11 eingestellt, verwendet.

Diese Verfahren (mit nachfolgender Dünnschichtchromatographie in Laufmittel 1) brachten jedoch keine verwertbare Auftrennung der Peptide.

#### 3.3.4.5 Trennung durch Gelfiltration und HPLC

Da die bisher beschriebenen Verfahren die Identifizierung der gefärbten Peptide nicht ermöglichten, wurden zunächst die tryptischen Peptide aus modifizierter GDH über ein Molekularsieb auf einer Säule vorgetrennt.

Dabei wurde neben der Absorption der Peptidbindungen bei 206 nm die Absorptionen der Azoverbindungen bei 405 nm registriert (Abb. 46). Bei dieser Wellenlänge absorbieren sowohl Mono- als auch Bisazohistidinverbindungen, sowie Azotyrosinverbindungen, wie aus den im Abschnitt 3.2.4 gemessenen Spektren hervorgeht. Diejenigen Fraktionen, die sowohl bei 206 nm als auch bei 405 nm absorbierten, wurden in zwei großen Fraktionen zusammengefaßt (schraffiert in Abb. 46). Sie wurden mit Hilfe von HPLC weiter aufgetrennt. Aus der zweiten Fraktion wurde ein großer und ein kleinerer Peak isoliert, doch auch in diesen Präparationen konnte kein tryptisches Peptid anhand seiner Aminosäurezusammensetzung identifiziert werden.

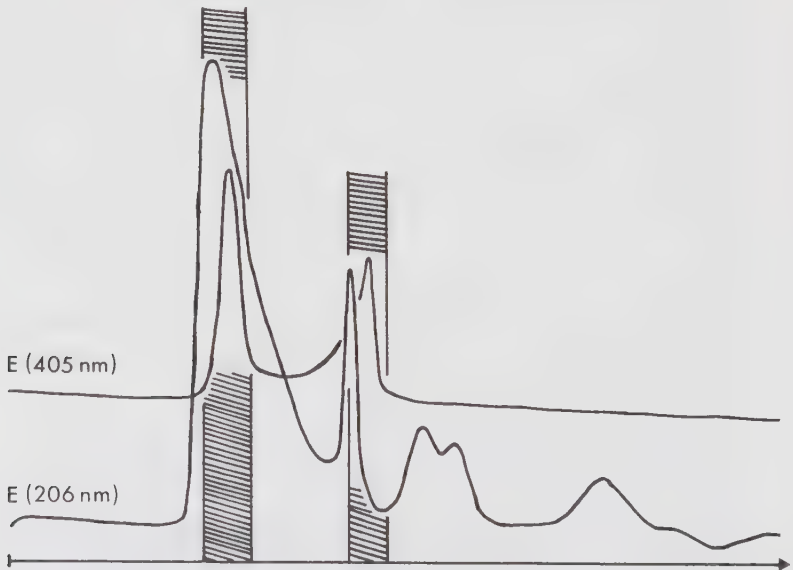


Abb. 46: Auftrennung tryptischer Peptide modifizierter GDH durch Gelfiltration: Extinktion in willkürlichen Einheiten bei 206 nm (Peptidbindungen) und bei 405 nm (Azogruppe). Die Fraktionen der schraffierten Bezirke wurden jeweils vereinigt und mit HPLC weiter aufgetrennt (sh. Text).

3.3.5      Versuche mit modifizierter GDH:  
Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Obwohl es gelungen war, die GDH mit Hilfe von p-Nitrodiazobenzol zu inaktivieren, konnte die auftretende gelbliche Färbung photometrisch keiner Azo-Aminosäureverbindung zugeordnet werden, da kein eindeutiges Absorptionsmaximum meßbar war.

Das nach Abschluß der tryptischen Spaltung gemessene Absorptionsmaximum bei 340 nm läßt sich keiner bestimmten Azoaminosäureverbindung zuordnen, da die Absorptionseigenschaften der möglicherweise bei der Kupplung entstehenden Verbindungen nicht bekannt waren. Daher war es auch nicht möglich, aus dem Spektrum modifizierter GDH den Gehalt der Lösung an den in Frage kommenden Azoverbindungen zu errechnen.

Weiter muß in Betracht gezogen werden, daß auch andere Aminosäureseitenketten außer Histidin oder Tyrosin mit p-Nitrodiazobenzol gekuppelt haben können.

In den Vorversuchen war keine solche Kupplung nachgewiesen bzw. untersucht worden. Reaktionen des p-Nitrodiazobenzols mit Seitenketten von Cystein, Lysin oder auch Arginin können jedoch nicht ausgeschlossen werden, wie die in Abschnitt 3.1.3.3 zitierten Literaturstellen zeigen.

Diese Kupplungsreaktionen würden zum Auftreten weiterer Absorptionsmaxima führen, die in ihrer Summe zu der beobachteten unspezifischen Absorptionserhöhung führen könnten (sh. Abb. 43).

Allerdings tritt nach Riordan (48) ein solches unspezifisches Absorptionsband oft im Spektrum von Azoproteinen auf (Nachbargruppeneffekte), obwohl nur bestimmte Aminosäuren mit den Diazoverbindungen gekuppelt hatten.

Von den tryptischen Peptiden modifizierter GDH konnten mehrere chromophore Peptide abgetrennt werden. Die Aminosäurezusammensetzung dieser Peptide konnte jedoch nicht ermittelt werden.

Daher muß zunächst unklar bleiben, mit welchen Seitenketten der GDH die zugegebene Diazoniumverbindung gekuppelt hat.

Auch durch probatorischen Einsatz von HPLC, die nicht routinemäßig zur Verfügung stand, konnte kein gefärbtes Peptid identifiziert werden.

Wenn man annimmt, daß andere Aminosäureseitenketten, wie z.B. diejenigen von Lysin oder Arginin ebenfalls mit der Diazoniumverbindung reagieren können, so könnte dies erklären, warum bei der Spaltung der modifizierten GDH mit Trypsin ein Teil des Proteins ungespalten blieb. Nach Needleman (28) wird Lysin als potentielle Spaltstelle von Trypsin nicht erkannt, wenn die  $\epsilon$ -Aminogruppe blockiert ist, wie dies durch Kupplung mit einem Diazoniumreagenz der Fall wäre. Gleiches gilt auch für eine Kupplung mit der Seitenkette von Arginin. Aber auch durch die Modifizierung von Seitenketten in unmittelbarer Nachbarschaft von Lysin oder Arginin kann die enzymatische Spaltung an diesen Stellen verhindert werden (1).

Findet die tryptische Spaltung nicht konstant bei **jedem** Lysin oder Arginin statt, so entstehen größere Spaltstücke. Zu den 39 "echten" tryptischen Peptiden der GDH kommen so weitere hinzu, die sich mit jenen in der Sequenz z.T. überlappen. Aufgrund der großen Zahl der Spaltstücke können sie im Fingerprint nicht mehr abgetrennt werden.

Möglicherweise bleiben auch größere Proteinteile ungespalten; sie lösen sich nicht und bleiben an der Auftragsstelle liegen, wie es in den Versuchen der Fall war.

Chymotryptische und pseudotryptische Aktivität der Trypsinlösung, die auch in Präparationen reinen Trypsins in geringem Maße vorhanden ist, können bei der verlängerten Spaltungszeit ebenfalls zum Auftreten "unspezifischer" Peptide führen (Spaltung nach Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan und anderen Aminosäuren (1,29)). Aus diesem Grund wird üblicherweise eine Spaltungszeit von maximal 1,5 h mit maximal 3% Trypsin empfohlen (1). Diese Grenzen konnten jedoch hier, wie erläutert, z.T. nicht eingehalten werden. So entstünden Peptide von nicht vorhersagbarer Sequenz, die die Peptidmischung weiter verunreinigen.

Diese Peptide wären allein anhand ihrer Aminosäurezusammensetzung nicht identifizierbar, da nicht bekannt ist, an welchen Aminosäuren die Spaltung erfolgte.

Ein weiterer Grund für die mangelhafte Auftrennung der Peptide im Fingerprint könnte die Bildung von Aggregaten sein, die durch die eingeführten Azogruppen begünstigt worden sein könnte. Dadurch wäre die Auftrennung einiger Peptide, die bei der Kupplung entstanden, verhindert worden, wodurch mit den gefärbten auch andere Peptide wanderten, und bei der Elution der gefärbten Peptidflecken kein reines Peptid in Lösung ging.

Eine Verunreinigung der eluierten Peptide wäre weiters auch dadurch möglich, daß die Peptidflecken trotz der Verwendung von Platten der Größe 20 x 20 cm nicht genau genug ausgekratzt werden konnten, da sie sich vermutlich gegenseitig überlappten, obwohl sie in der Fluramfärbung getrennt erschienen waren. Dies ist bei dieser Färbung nicht mit Sicherheit auszuschließen.

Eine Fehlerquelle konnte auch in der Wahl der Hydrolysezeiten liegen, die für die durch die synthetisierten Azogruppen hydrophob gewordenen Peptide zu kurz gewesen wären, so daß keine vollständige Hydrolyse möglich war und somit nicht alle im Peptid enthaltenen Aminosäuren in der Aminosäurenanalyse registriert wurden.

### 3.3.6 Überlegungen zu weiterführenden Experimenten

Folgende Fragen müssen in weiteren Experimenten geklärt werden, damit die in dieser Arbeit angestrebten Aussagen gemacht werden können:

- 1) Es sollte herausgefunden werden, warum bei der Umsetzung von GDH mit der Diazoniumverbindung keine abgrenzbaren Absorptionsmaxima entstanden. Woenckhaus hatte bei der Umsetzung von LDH mit Diazonium-Analogen von NAD photometrisch deren Einbau verfolgen können (11). Durch eine vollständige Hydrolyse des modifizierten Proteins durch HCl oder eine Aminopeptidase könnte durch Vergleich mit entsprechenden Aminosäuremodellverbindungen festgestellt werden, welche Aminosäuren im Protein modifiziert wurden. Hier sind noch erhebliche Schwierigkeiten zu erwarten, da die Azoverbindung des Histidins nicht säure-hydrolysestabil ist (48), und eine enzymatische Spaltung durch die eingebrachten Azogruppen erschwert werden kann.
- 2) Alternativ dazu könnten anhand von rein dargestellten Azo-Aminosäuremodellverbindungen die Extinktionskoeffizienten der möglichen im Enzym entstehenden Verbindungen gemessen werden und so photometrisch die entstandenen Azoverbindungen im Spektrum des modifizierten Enzyms bestimmt werden.

- 3) Weiter müßte geklärt werden, welche Verbindungen bei der Hydrolyse von Azo-Histidin entstehen, und wie sich die Azo- bzw. Diazoverbindungen verschiedener Aminosäuren in der Aminosäurenanalyse verhalten. Evtl. reagieren Spaltprodukte der Azoverbindung während der Hydrolyse mit anderen Aminosäuren, die sich in der Analyse deshalb nicht mehr nachweisen lassen. Dies hätte die Identifizierung der Peptide anhand ihrer Aminosäurezusammensetzung verhindert.
- 4) Es ist notwendig, weiter zu untersuchen, welche Verbindungen bei der Kupplung von Histidin mit der verwendeten Diazoniumverbindung entstehen können. Dies ist bisher kaum bekannt. Wie bereits im Kapitel 3.1.3.3 erläutert, ist nicht einmal geklärt, an welchen Atomen des Imidazolringes die Kupplung mit der Diazogruppe stattfindet. Erst wenn dies bekannt ist, ist eine exakte stöchiometrische Modifizierung des Enzyms möglich, und somit eine Aussage, welche und wieviele Aminosäurereste modifiziert wurden. Nur dann kann auch mit Sicherheit eine so kleine Menge der Diazoniumverbindung eingesetzt werden, daß nur die am meisten exponierte Aminosäure (die vermutlich am Aktivitätszentrum beteiligt ist) reagiert. Weiter ist nicht bekannt, welche Verbindungen bei dem Zerfall instabiler Azohistidinverbindungen entstehen, so daß sich die Azohistidinverbindungen auch nicht über ihre Zerfallsprodukte nachweisen lassen.
- 5) Es muß sichergestellt werden, daß die Spaltung des Enzyms in kleinere Peptide vorhersagbare Bruchstücke ergibt, deren Zusammensetzung man aus der Sequenz des Enzyms herleiten kann. Dies könnte z.B. durch die Verwendung von chemischen Spaltmethoden (BrCN alleine oder mit Hilfe einer nachfolgenden enzymatischen Spaltung) geschehen.

- 6) Die Auftrennung der entstehenden Peptide muß entscheidend verbessert werden, wobei sich als Möglichkeit die HPLC anbietet, die hier erst zum Schluß der experimentellen Arbeiten zur Verfügung stand.
- 7) Die Identifizierung der Peptide sollte durch andere Methoden (Endgruppenbestimmung , Sequenzierung) ergänzt werden. Dazu muß allerdings eine größere Menge der Peptide rein dargestellt werden, als durch die Trennverfahren auf Kieselgel-Platten in einem Arbeitsgang möglich ist. Durch die relativ große Schwankungsbreite der durchgeführten Chromatographien war es auch nicht möglich, mit Sicherheit die gleichen Peptide von verschiedenen Platten zu vereinigen. Sicher ist hier die HPLC zur Auftrennung und Präparation der Peptide die Methode der Wahl.

#### **4. Experimenteller Teil**

##### **4.1 Verwendete Materialien**

sn-Glycerin-3-phosphatdehydrogenase kristallin in Ammoniumsulfatsuspension 100 mg/10 ml, DAP und NADH wurden von der Fa. Boeringer/Mannheim bezogen. Alle anderen Reagentien waren Präparate der Firmen Merck oder Serva/Heidelberg von analytischem Reinheitsgrad. Die verwendeten Kieselgelplatten waren vom Typ 60 der Fa. Merck, ggf. mit Fluoreszenzindikator F-254.

Das Gel AcA 202 zur Gelfiltration wurde von der Fa. LKB/Schweden bezogen.

##### **4.2. Verwendete Puffer**

###### **TRA-EDTA/Puffer 0,1 M pH 7,6 und pH 8**

18,57 g Triäthanolamin werden zusammen mit 1861 mg EDTA (5 mmol) in Wasser gelöst, mit HCl auf pH 7,6 bzw. pH 8 eingestellt und auf 1 l aufgefüllt.

###### **Natriumacetatpuffer 0,75 M, pH 5, pH 4,5 und pH 4**

6,8 g Natriumacetat (50 mmol) und 6 g Essigsäure (100 mmol) werden in H<sub>2</sub>O gelöst, mit 1 N HCl oder 1 N NaOH auf pH 4, pH 4,5 oder pH 5 eingestellt und auf 200 ml aufgefüllt.

###### **Natriumacetatpuffer 0,5 M, pH 4**

9,52 g Natriumacetat (70 mmol) und 25,8 g Essigsäure (430 mmol) werden in 1 l H<sub>2</sub>O mit 1 N HCl auf pH 4 eingestellt.

#### **Natriumcitratpuffer 1,2 M bzw. 0,12 M, pH 3/pH 3,5**

3,53 g Trinatriumcitrat werden in 10 ml  $H_2O$  gelöst und mit HCl auf pH 3 eingestellt. 0,12 M Puffer wird daraus durch Verdünnen mit  $H_2O$  hergestellt, der pH beträgt 3,5.

#### **Natriumpyrophosphatpuffer 0,1 M, pH 8 bzw. pH 6**

44,6 g  $Na_4P_2O_7$  werden in  $H_2O$  gelöst, mit HCl auf pH 8,0 bzw. pH 6,0 eingestellt und auf 1 l aufgefüllt.

#### **Kaliumcarbonatpuffer 2,3 M und 1,15 M**

818 mmol  $K_2CO_3$  und 1482 mmol  $KHCO_3$  werden in 1 l  $H_2O$  gelöst. 1,15 M Kaliumcarbonatpuffer wird durch Verdünnen mit  $H_2O$  hergestellt.

#### **AHC-Puffer 50 mM und 100 mM**

7,9 g Ammoniumhydrogencarbonat werden in 1 l  $H_2O$  gelöst. 50 mM AHC-Puffer wird durch Verdünnen erhalten.

### **4.3. Messung von Absolut- und Differenzspektren**

Die gezeigten Spektren wurden im Elmer Spectrophotometer 550 S UV-VIS/Recorder 561 der Fa. Perkin-Elmer/Überlingen bzw. im Shimadzu Double Beam Spectrophotometer UV-300 der Fa. Shimadzu Seisakusho Ltd., Kyoto, Japan in Quarzglasküvetten der Dicke 1 cm gemessen. Der Wellenlängenbereich war üblicherweise 600 nm bis 240 nm.

Artefakte sind in den Darstellungen ausgeglichen. Soweit nicht anders angegeben, wurden Absolutspektren im splitted-beam-mode gegen  $\text{H}_2\text{O}$  gemessen, und Differenzspektren wie erläutert gegen eine Referenzlösung, die mit Ausnahme der jeweils zu messenden Substanz die gleichen Reagenzien wie die Probe enthielt und gleich behandelt worden war.

#### **4.4. Diazotierung von Sulfanilsäure und Kupplung mit N-Acetylhistidin**

##### **4.4.1 Verwendete Lösungen**

###### **Sulfanilsäure**

Sulfanilsäure wurde 1%ig in 1 N HCl bzw. in 1,4 N HCl bzw. in 0,15 N HCl für modifizierten Ansatz (3.2.3.4) gelöst.

###### **Natriumnitrit**

$\text{NaNO}_2$  wurde, wenn nicht anders angegeben, 5%ig in  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Bis zu 14 Tage Lagerung bei  $4^\circ\text{C}$  waren ohne Einfluß auf das Versuchsergebnis bzw. die Stabilität der Kupplungsprodukte.

###### **N-Acetylhistidin**

$\alpha$ -N-Acetylhistidin wurde 1 mM in 0,1 M TRA/EDTA/Puffer gelöst (197 mg/l).

Alle Lösungen wurden bei  $0 - 4^\circ\text{C}$  aufbewahrt und im allgemeinen nach ca. 1 Woche erneuert.

#### 4.4.2.      Diazotierung von Sulfanilsäure

##### **Spektren von Diazobenzolsulfonsäure**

5,7 mg Sulfanilsäure werden in 10 ml 0,14 N HCl gelöst und auf 0°C gekühlt.

200 mg NaNO<sub>2</sub> werden in 10 ml H<sub>2</sub>O gelöst und ebenfalls auf 0°C abgekühlt.

Zu 200 µl der Sulfanilsäurelösung werden im Eisbad innerhalb ca. 25 s 50 µl der NaNO<sub>2</sub>-Lösung gegeben. Das Gemisch wird mit 2,5 ml 1,15 N HCl verdünnt. Das Spektrum dieser Lösung wird gegen 0,15 N HCl aufgenommen. Zur Variation der Menge der Sulfanilsäure im Diazotierungsansatz wird ein Teil der Sulfanilsäurelösung durch 0,15 N HCl ersetzt. Die Konzentration der Sulfanilsäure im Ansatz ist ohne qualitativen Einfluß auf die Stabilität der Diazobenzolsulfonsäurelösung.

#### 4.4.3      Kupplung mit N-Acetylhistidin

##### **Zuerst angewendete Verfahren**

500 µl der Sulfanilsäurelösung (1%ig in 1 N HCl) werden mit 50 µl der N-Acetylhistidinlösung vereinigt und im Eisbad auf 0°C gekühlt. 500 µl der ebenfalls auf 0°C gekühlten NaNO<sub>2</sub>-Lösung werden langsam zugegeben.

Nach 5 min. werden 500 µl M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zugegeben, wobei sich die Lösung rötlich färbt. Es entweicht Gas.

Die Referenzlösung enthält statt N-Acetylhistidin TRA-EDTA-Puffer und wird wie die Probe behandelt.

### **Ansatz nach Sluyterman (53)**

Versuchsablauf wie oben. Statt in 1 N HCl wurde Sulfanilsäure in 1,4 N HCl gelöst. Nach 10 min. wurden 1,5 ml 2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  zugegeben und exakt nach 2 min. 5 ml 75%iges Ethanol. Bei der Zugabe von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und von Ethanol fielen jeweils Kristalle aus. Diese wurden abzentrifugiert. Vom Überstand wurde ein Spektrum gegen eine entsprechend behandelte Referenzlösung gemessen.

### **Modifiziertes Verfahren**

Im modifizierten Ansatz wird Sulfanilsäure in 1,15 N HCl gelöst und statt 500  $\mu\text{l}$   $\text{NaNO}_2$  1 ml verwendet. Von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  werden 500  $\mu\text{l}$  zugegeben, und 2 min. später 5 ml 20%iges Ethanol. Von dieser Lösung wird ebenfalls gegen eine entsprechende Referenz ein Differenzspektrum aufgenommen.

### **Weitere Variationen des Verfahrens**

1. Die Geschwindigkeit der Zugabe von  $\text{NaNO}_2$  wird durch Einlaufenlassen aus einer Glaspipette (kontrolliert mit Stoppuhr) auf 2  $\mu\text{l/s}$  (bzw. bei größeren Volumina von  $\text{NaNO}_2$  auf 5  $\mu\text{l/s}$ ) gehalten.

2. Zur Kupplung werden andere Puffer (0,12 M Trisnatriumcitrat (pH 3,5) und 0,5 M Natriumacetatpuffer, pH 5,0) verwendet. Nur in Natriumacetatpuffer entstehen gefärbte Verbindungen, allerdings in weit geringerem Ausmaß als bei pH 10 in  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

#### 4.5 Diazotierung von p-Nitroanilin und Kupplung mit N-Acetylhistidin, N-Acetyltyrosin und N-Acetylcystein

##### 4.5.1 Verwendete Lösungen

1. 800 mg p-Nitroanilin werden in 100 ml 3 M HCl gelöst (58 mM), die Lösung ist gelb. Sie wird erst kurz vor Verwendung gekühlt, da p-Nitroanilin sonst ausfällt.

2. 5 g  $\text{NaNO}_2$  werden in 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst (58 mM). Die Lösung ist klar und farblos, sie sollte nicht länger als eine Woche bei maximal  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt werden.

3. 11,43 mg N-Acetylhistidin (58  $\mu\text{mol}$ ) werden in 1ml Natriumpyrophosphatpuffer gelöst. Davon werden 10  $\mu\text{l}$  mit 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  und 1 ml 2,3 M Kaliumcarbonatpuffer verdünnt. Wenn nicht anders angegeben, wird immer eine so hergestellte Lösung verwendet.

In dem Referenzansatz wird jeweils 1,15 M Kaliumcarbonatpuffer statt der jeweiligen Aminosäurelösung verwendet. Für die Kupplung bei pH 8 werden 10  $\mu\text{l}$  der konzentrierten N-Acetylhistidinlösung mit Natriumpyrophosphatpuffer auf 2 ml verdünnt. Die Ansätze sind jeweils 290  $\mu\text{M}$  an N-Acetylhistidin.

##### 4.5.2 Diazotierung von p-Nitroanilin

Gleiche Teile der gekühlten Lösungen von p-Nitroanilin und  $\text{NaNO}_2$  werden bei  $0^\circ\text{C}$  langsam vereinigt. Nach 15 min ist die Diazoniumsalzlösung verwendbar und für mehrere Stunden im Eisbad haltbar.

#### 4.5.3 Kupplungsversuche mit N-Acetylhistidin

##### **Erste Versuche, Spektren**

Zunächst werden 5 - 40  $\mu$ l der p-Nitrodiazobenzollösung zu 100  $\mu$ l der Lösung von N-Acetylhistidin in 1,15 M Kaliumcarbonatpuffer gegeben. Nach 2 min. wird mit  $H_2O$  verdünnt und ein Spektrum gegen die Referenz gemessen.

Für die Messung des Spektrums bei verschiedenem pH werden die Ansätze nach Ablauf der Kupplungszeit statt mit  $H_2O$  mit Natriumacetatpuffer (pH 4) oder Natrium-pyrophosphatpuffer (pH 6 und pH 8) sowie mit Kaliumcarbonatpuffer (pH 10,5) verdünnt.

##### **Erstes Verfahren zur stabilen Kupplung von Diazo-p-nitroanilin mit N-Acetylhistidin**

Die Kupplung wird wie oben beschrieben durchgeführt, für den Versuch für Abb. 18 werden 50  $\mu$ l Diazoniumlösung zu 500  $\mu$ l der Lösung von N-Acetylhistidin (molares Verhältnis 10 : 1) in 1,15 M Kaliumcarbonatpuffer gegeben. Nach 2 min. werden 100  $\mu$ l daraus in 2 ml  $H_2O$  verdünnt, ein Spektrum gegen die Referenz gemessen und dann 100  $\mu$ l 3 M HCl zugegeben.

Wenn kein Gas mehr entweicht, wird mit 40  $\mu$ l 8,25 M NaOH wieder alkalisiert und wiederum ein Spektrum gegen die entsprechend behandelte Referenz gemessen (Abb. 18). Dann werden die Lösungen 1 h bei Raumtemperatur mit Luft durchperlt. Das danach gemessene Spektrum und das 5 Tage später gemessene Spektrum unterschieden sich kaum von dem in Abb. 18 gezeigten Spektrum, die Extinktionsdifferenz ist nach 5 Tagen im gesamten Bereich um ca. 0,01 abgesunken.

Für die Versuchsreihen von Abb. 19, 20 und 21 werden auf 1 ml der 290  $\mu$ M N-Acetylhistidinlösung (in 1,15 M Kaliumcarbonatpuffer) 10  $\mu$ l der Diazoniumsalzlösung (29 mM) verwendet und mit 1,15 M Kaliumcarbonatpuffer auf 1,1 ml aufgefüllt. Zu verschiedenen Zeitpunkten (sh. Abb. 21) werden 200  $\mu$ l entnommen, in 2 ml  $H_2O$  verdünnt und mit 100  $\mu$ l 3 M HCl angesäuert. Dann wird gerührt, bis kein Gas mehr entweicht, und mit 50  $\mu$ l 3 M NaOH und 100  $\mu$ l 2,3 M Kaliumcarbonatpuffer alkalisiert. Nach diesem Verfahren werden auch alle weiteren Versuche durchgeführt.

Spektren werden jeweils gegen eine entsprechende Referenzlösung sofort nach dem Verdünnen, 3 h, 16 h und 6 Tage später gemessen.

Abb. 19 zeigt das Verhalten der Absorption bei 380 nm und 530 nm über diesem Zeitraum, und Abb. 20 zeigt die Spektren der 15-min.-Ansätze sofort, 16 h und 6 Tage nach Realkalisieren.

Abb. 21 zeigt den Verlauf der Extinktionsdifferenzen bei 380 nm und bei 530 nm über die Zeit.

### Versuchsbeschreibung zu Abb. 23

Zu 500  $\mu$ l N-Acetylhistidin (14,6 mM) in 2,3 M Kaliumcarbonatpuffer werden 100  $\mu$ l 3 M NaOH gegeben und 500  $\mu$ l einer wie beschrieben hergestellten Diazoniumsalzlösung (29 mM) zugegeben. Dies entspricht einem molaren Verhältnis von Diazoniumsalz : N-Acetylhistidin = 2 : 1. Nach 7 min. werden 300  $\mu$ l 7,5 M HCl zugegeben, und nach Ausrühren von  $CO_2$  150  $\mu$ l 7,5 M NaOH und 500  $\mu$ l 2,3 M Kaliumcarbonatpuffer zugegeben. Die Reaktionsprodukte fallen z.T. aus, lösen sich jedoch bei der für die Messung nötigen Verdünnung mit  $H_2O$  wieder. Die Referenz wird entsprechend behandelt; anstelle der N-Acetylhistidinlösung wird 2,3 M Kaliumcarbonatpuffer verwendet.

### Versuchsablauf zu Abb. 24 und 25

Zur Messung der Spektren bei verschiedenen Verhältnissen von Diazoniumsalz zu N-Acetylhistidin werden zu 1 ml einer 290  $\mu$ M Lösung von N-Acetylhistidin (in 1 ml 1,15 M Kaliumcarbonatpuffer) 5 bis 100  $\mu$ l der 29 mM Diazoniumsalzlösung (entsprechend einem Verhältnis von 1 : 0,5 bis 1 : 10) gegeben, mit 1,15 M Kaliumcarbonatpuffer auf 1,1 ml aufgefüllt und gerührt. Nach 5 min werden 200  $\mu$ l entnommen und wie oben beschrieben weiterverarbeitet.

Zur Messung des Einflusses der Diazoniumsalzkonzentration werden jeweils 58 nmol N-Acetylhistidin (= 200  $\mu$ l der 290  $\mu$ M Lösung in 1,15 M Kaliumcarbonatpuffer) mit 1,15 M Kaliumcarbonatpuffer auf Volumina von 400  $\mu$ l, 1 ml und 2 ml verdünnt. Für ein Volumen von 200  $\mu$ l wird die 290  $\mu$ M N-Acetylhistidinlösung unverdünnt verwendet. Die jeweiligen Konzentrationen sind aus Abb. 26 ersichtlich. Die 29 mM Diazoniumsalzlösung wird mit 4 Teilen  $H_2O$  verdünnt.

Jeweils 20 ml davon werden zu den N-Acetylhistidinlösungen gegeben. Nach 5 min. Kupplungszeit wird wie oben beschrieben verdünnt, angesäuert und alkalisiert.

### Synthese größerer Mengen der Kupplungsprodukte

Zur Synthese und Isolierung größerer Mengen von Mono- und Bisazohistidin wird folgender Versuchsansatz verwendet:

250 ml einer 5%igen  $NaNO_2$ -Lösung und 250 ml einer 0,8%igen p-Nitroanilinlösung in 3 M HCl werden bei 3°C in Eisbad innerhalb von 30 min. unter ständigem Rühren unter dem Abzug (Entweichen von  $NO_x$ !) vereinigt.

Nach weiteren 15 min. wird die ebenfalls gekühlte N-Acetylhistidinlösung zugegeben. 1,48 g N-Acetylhistidin-HCl in 500 ml 2,3 M Kaliumcarbonatpuffer sind mit 60 ml 7,5 M NaOH-Lösung vereinigt worden, um den pH während der Kupplung nicht absinken zu lassen.

Bei der Zugabe der N-Acetylhistidinlösung färbt sich die Lösung schwarz, und schwarze Teilchen fallen aus. Während der Zugabe von 250 ml 3 M HCl färbt sich die Lösung tief rot, wobei der größte Teil des ausgefallenen Materials gelöst wird.

Dann werden 200 ml 7,5 M NaOH und 500 ml 2,3 M Kaliumcarbonatpuffer zugegeben.

Vom Überstand und von den ungelösten Bestandteilen des Reaktionsgemisches werden jeweils Proben in  $H_2O$  verdünnt und ein Spektrum gemessen (Abb. 30).

### Kupplung bei pH 8

Dazu wird N-Acetylhistidin aus der 59 mM Lösung in Natriumpyrophosphatpuffer 1 : 200 in Natriumpyrophosphatpuffer verdünnt. Wie oben beschrieben wird eine entsprechende Menge Diazoniumsalzlösung (für Abb. 38 im molaren Verhältnis 1 : 1) zugegeben.

Nach 10 min. Kupplungszeit wird in 0,1 M Kaliumcarbonatpuffer (erhalten durch Verdünnung aus 2,3 M Kaliumcarbonatpuffer) 1 : 10 verdünnt, ein Spektrum geschrieben und dann wie oben beschrieben weiter stabilisiert. Diese Lösungen sind wie die in den vorhergehenden Versuchen hergestellten über mehrere Tage stabil.

#### 4.5.4 Kupplung von p-Nitrodiazobenzol mit N-Acetyltyrosin und N-Acetylcystein

##### **Kupplung mit N-Acetyltyrosin**

Für die Messungen zu Abb. 27 und 28 werden eine 58 mM Lösung von N-Acetyltyrosin in H<sub>2</sub>O mit 1,15 M Kaliumcarbonatpuffer auf 1,45 mM bzw. 290 uM verdünnt.

- a) Für ein Verhältnis Diazoniumsalz zu N-Acetyltyrosin von 0,25 : 1 bis 2 : 1 wird jeweils 1 ml der 1,45 mM N-Acetyltyrosinlösung mit 10 - 100 ml der Diazoniumsalzlösung versetzt und mit H<sub>2</sub>O auf 1,2 ml aufgefüllt.
- b) Für den Bereich 1 : 1 bis 10 : 1 wird 1 ml der 290 uM N-Acetylhistidinlösung mit 10 bis 100 ul der Diazoniumsalzlösung versetzt und ebenfalls auf 1,2 ml aufgefüllt.

Nach jeweils 5 min werden 200 ul daraus in 2 ml H<sub>2</sub>O verdünnt. Gegen eine entsprechend behandelte Referenzlösung, die kein N-Acetyltyrosin enthält, werden die Differenzspektren gemessen, deren Extinktionswerte bei 520 und 550 nm in Abb. 28 eingetragen sind.

Um die Werte der Gruppe a) mit den Meßwerten der Gruppe b) vergleichen zu können, werden erstere mit dem Faktor 0,2 multipliziert.

Bessere Resultate im Bereich unter 400 nm werden erhalten, wenn die Ansätze bereits vor Zugabe der Diazoniumsalzlösung mit 1,15 M Kaliumcarbonatpuffer auf das entsprechende Volumen aufgefüllt werden. Dadurch tritt das Maximum bei 370 nm deutlicher hervor; dies konnte allerdings nicht immer reproduziert werden.

## Kupplung mit N-Acetylcystein

Aus einer 58 mM Lösung von N-Acetylcystein in 0,1 M HCl wird eine 580  $\mu$ M Lösung in 1,15 M Kaliumcarbonatpuffer hergestellt. Zu 200  $\mu$ l dieser Lösung werden 20  $\mu$ l der Diazoniumsalzlösung gegeben. Nach 5 min. werden 200  $\mu$ l davon in 2 ml H<sub>2</sub>O verdünnt und wie oben beschrieben stabilisiert. Das dann gemessene Differenzspektrum zeigt Abb. 29.

Mit anderen Mengenverhältnissen der Reaktanden werden keine größeren oder besser signifikanten Extinktionsdifferenzen erzielt.

### 4.6 Enzymtest

#### 4.6.1 Materialien

GDH wird in den Vorversuchen zur Ermittlung der nativen Enzymaktivität aus der Suspension in Ammoniumchlorid mit TRA-EDTA-Puffer bzw. Natriumpyrophosphatpuffer verdünnt.

Für die Kupplung mit p-Nitrodiazobenzol wird das Enzym wie unten beschrieben dialysiert und der Enzymtest gleichfalls mit dialysierter GDH durchgeführt.

NADH wird bei -20°C gelagert und bei Bedarf im jeweiligen Puffer 1%ig gelöst. Diese Lösung kann mehrere Tage eisgekühlt bzw. gefroren brauchbar gehalten werden.

DAP wird als Dicyclohexylammoniumsalz des DAP-dimethylketals bezogen. Jeweils nominell 100 mg werden in 12 ml H<sub>2</sub>O gelöst und mit 600  $\mu$ l 4 N HCl versetzt.

Die Mischung wird im siedenden Wasserbad 3 min. erhitzt und dann portioniert und tiefgefroren aufbewahrt. So ist die DAP-Lösung über mehrere Wochen haltbar.

Die Konzentration des DAP in dieser Lösung beträgt rechnerisch 20 mM; eigene Messungen ergaben zwischen 15 und 18 mM. In den durchgeführten Enzymtests hatten diese Schwankungen keinen Einfluß auf die gemessene Enzymaktivität.

#### 4.6.2      Messung der Enzymaktivität

Die Enzymaktivität wird anhand der Umsetzung von NADH zu NAD bei der Reaktion:



photometrisch durch Messung der Extinktion des NADH bei 365 nm bei pH 8 bestimmt.

In 0,5 ml des TRA-EDTA-Puffers bzw. des Natriumpyrophosphatpuffers (25°C) werden 10 µl der NADH-Lösung und ein Aliquot der zu bestimmenden Enzymlösung (ggf. in Natriumpyrophosphatpuffer verdünnt) gegeben. Die Reaktion wird durch Zugabe von 20 µl der DAP-Lösung zu der Enzymlösung gestartet.

Die Extinktionsänderung wird mit dem Eppendorf Photometer bei 365 nm gemessen und auf einem Schreiber gegen die Zeit registriert. Als Maß für die Enzymaktivität diente die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit sofort nach Start der Reaktion, die durch Anlegen einer Tangente an die Extinktionskurve ermittelt wird.

#### 4.7      Modifizierung von GDH mit p-Nitrodiazobenzol

##### 4.7.1      Vorbereitung der GDH

Ein bestimmtes Volumen der Kristallsuspension des Enzyms in  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  wird zentrifugiert (3 min. Laborzentrifuge Eppendorf) und der Niederschlag in gleichem Volumen Natriumpyrophosphatpuffer gelöst.

Dann wird 12 h bei 4°C gegen das 1000fache Volumen Natriumpyrophosphatpuffer dialysiert.

Die Enzymlösung wird dann im 3fachen des ursprünglichen Volumens Natriumpyrophosphatpuffer aufgenommen und bei 4°C bzw. im Eisbad aufbewahrt. Die Aktivität bleibt so über mehrere Tage konstant. (Konzentration des Enzyms (UE) in dieser Lösung: 3,3 g/l = 88 µM UE).

#### 4.7.2 Kupplung der GDH mit p-Nitrodiazobenzol

Die Diazoniumsalzlösung wird wie oben beschrieben hergestellt. Je nach gewünschtem Verhältnis Diazoniumsalz zu GDH wird die Diazoniumsalzlösung zunächst mit Wasser verdünnt, um pipettierbare Mengen zu erhalten. Bei einem Verhältnis Diazoniumsalz : GDH-UE > 10 ist eine Verdünnung der Enzymlösung mit gleichem Volumen des Puffers notwendig, um den pH bei der Zugabe des sauren Diazoniumlösung nicht absinken zu lassen. Dieser Pufferzusatz genügt für alle durchgeführten Versuche. Die Ansätze werden im Eisbad inkubiert.

#### 4.7.3 Messung der Inaktivierung

Zu verschiedenen Zeitpunkten werden Proben entnommen, in Natriumpyrophosphatpuffer geeignet verdünnt und im Enzymtest die Aktivität bestimmt. Das Diazoniumsalz, das durch die Proben in die Lösung des enzymatischen Tests eingebracht wird, hat keinen Einfluß auf die Bestimmung der Enzymaktivität.

Gleichzeitig werden Referenzlösungen unbehandelter dialysierter GDH zu verschiedenen Zeitpunkten entsprechend verdünnt und deren Aktivität getestet.

Der Einfluß von p-Nitroanilin auf die Enzymaktivität wird durch Testen der Aktivität 5, 10 und 40 min. nach Zugabe der p-Nitroanilin-Lösung untersucht (p-Nitroanilin : GDH-UE = 3,3 : 1).

#### 4.7.4      Darstellung modifizierter GDH

Zur Darstellung modifizierter GDH werden pro mol UE GDH 4,8 bis 5,2 mol Diazoniumsalz (berechnet aus der Konzentration des eingesetzten p-Nitroanilin) zugegeben; dies führt zu einem Aktivitätsverlust von ca. 90%, der im parallel durchgeführten enzymatischen Test bestimmt wird.

Ein Spektrum der modifizierten Proteinlösung wird gegen eine Referenz gemessen, die gleichviel Diazoniumsalz in Natriumpyrophosphatpuffer wie der Ansatz enthielt. Dieses Spektrum zeigt Abb. 43.

Nach Ablauf der Kupplungszeit wird ein gleiches Volumen 2,3 M Kaliumcarbonatpuffer zugegeben; danach wird mit ca. doppeltem Volumen 3 M HCl langsam angesäuert, bis kein CO<sub>2</sub> mehr entweicht; der pH liegt dann bei etwa 1,5. Das in den Vorversuchen erfolgte Realkalisieren hat keine Bedeutung für die Stabilität und wird lediglich zur Messung der Spektren bei definiertem pH durchgeführt.

#### 4.7.5      Präparation tryptischer Peptide

Nach dem Stabilisierungsvorgang wird 5%ige TCA in gleichem Volumen zugegeben. Unbehandelte dialysierte GDH wird durch Zugabe von 1 ml 5%iger TCA pro 3 mg Protein denaturiert.

Die Ansätze werden 10 min bei 12100 g zentrifugiert, und der Niederschlag mit 0,1 M AHC so lange gewaschen, bis der pH im AHC-Puffer bei > 8 liegt. Das denaturierte Protein wird im Ultraschallbad und mit Hilfe eines Potters suspendiert und bei 37°C tryptisch gespalten (nach (1)).

Die Referenzansätze lassen sich durch dreimalige Zugabe von je 10 µg Trypsin pro mg GDH in Abständen von 30 min leicht spalten. Zu den modifizierten Ansätzen muß bis zu fünfmal 1 Gew.-% Trypsin zugegeben werden, und die Spaltungszeit auf bis zu 3 h erhöht werden. Selbst unter diesen Bedingungen gelingt es jedoch nicht, das Protein vollständig in Lösung zu bringen, was als Kriterium dafür gewertet wird, daß die Spaltung des Proteins nicht vollständig abgelaufen ist.

Nach Beendigung der tryptischen Spaltung werden die Lösungen gefriergetrocknet. Um das enthaltene AHC zu entfernen, wird das Vakuum weitere 2 h aufrechterhalten. Zur Erleichterung der Sublimation wird sodann die Probe in wenig H<sub>2</sub>O wieder gelöst. Darauf wird die Probe nochmals für weitere 8 h lyophilisiert.

Die Peptide werden in wenig H<sub>2</sub>O, in 25%igem Methanol, 80%iger Essigsäure, 80%iger Ameisensäure oder im Laufmittel der Dünnschichtchromatographie bis zu einer Konzentration von rechnerisch 10 mg/ml gelöst. Es blieben jedoch immer unlösliche Bestandteile zurück.

#### 4.8 Angewandte Trennverfahren

##### 4.8.1 Dünnschicht-Chromatographie der Azo- verbindungen von N-Acetylhistidin, N-Acetyl- tyrosin und N-Acetylcystein sowie von tryptischen Peptiden modifizierter und nativer GDH

Es werden Kieselgel-60-Platten der Fa. Merck ohne  
Fluoreszenz-Indikator verwendet.

Laufmittel 1: Chloroform : Methanol :  $\text{NH}_3$  (25%)  
wie 40 : 40 : 20 (v/v/v)

Laufmittel 2: Pyridin : Eisessig : n-Butanol :  $\text{H}_2\text{O}$   
wie 40 : 14 : 68 : 25 (v/v/v/v)

Laufmittel 3: Eisessig : Butanol :  $\text{H}_2\text{O}$   
wie 12 : 24 : 60 (v/v/v)  
(nach Stahl (57))

Chromatographiert wird bei 4°C; die Glaskammern werden  
1/4 h vor Beginn mit 100 ml Laufmittel gefüllt. Zur  
Vermeidung von Außeneinflüssen (Zugluft) werden die  
Kammern unter einen Karton gestellt.

Laufmittel 3 wird nach guter Durchmischung in die  
Kammer gefüllt. Nach ca. 1/4 h hatten sich zwei Phasen  
getrennt. In diesem Gemisch wird mit gutem Ergebnis  
chromatographiert.

Die Proben werden in 2 cm Abstand vom unteren Rand in  
1 - 2 cm Abstand voneinander mit einer Kunststoff-  
Kapillare in Portionen von 0,5 bis 1  $\mu\text{l}$  aufgetragen  
(bis zu einer Gesamtmenge von 2 nmol/Platte 10 x 10 cm  
bzw. von 6 nmol/Platte 20 x 20 cm), und mit dem Fön  
vorsichtig getrocknet.

Direkt nach der Chromatographie werden farbige Flecken und die Lösungsmittel-Front markiert, dann bei 90°C 1/2 h (Laufmittel 2 und Laufmittel 3: 130°C / 1/2 h) getrocknet. Bei der Chromatographie der tryptischen Peptide werden die gefärbten Peptide beim Trocknen gelblich und sind dann erheblich schwächer gefärbt; dies ist durch Bedampfen mit  $\text{NH}_3$  rückgängig zu machen.

### **Anfärben von Peptiden**

Die Chromatogramme der tryptischen Peptide der GDH werden nach dem Trocknen und Auskühlen der Kieselgel-Platten mit 0,05% Fluorescaminlösung in Aceton (19,60) angefärbt, und die bei UV-Licht der Wellenlängen 256 nm und 366 nm sichtbaren Banden und ihre Intensität markiert.

### **Anfärben von Histidin- bzw. Tyrosinseitenketten**

(modifiziert nach Pauly aus (3))

500 mg Sulfanilsäure werden in 50 ml 1 M HCl gelöst und mit einer Lösung von 2,5 g  $\text{NaNO}_2$  in 50 ml  $\text{H}_2\text{O}$  bei 0°C vereinigt. Nach 15 min. kann mit dieser Lösung die Platte besprüht werden. Gleich darauf wird die Platte mit einer 2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung besprüht. Histidinhaltige Bezirke färben sich rot bis violett an. Tyrosinhaltige Bezirke färben sich braunrot an.

Die Lösung der diazotierten Sulfanilsäure ist im Eisbad mehrere Stunden lang haltbar.

Es können noch Flecke mit 0,5 nmol N-Acetylhistidin nachgewiesen werden. Die Unterscheidung zwischen Histidin und Tyrosin erfolgt anhand der Färbung im Vergleich mit aufgetragenen Referenzproben.

Die angefärbten Stellen werden entsprechend markiert.

## Fingerprint-Technik zur Auftrennung der tryptischen Peptide

Der Probenauftrag erfolgt im rechten unteren Eck (ca. 3 nmol/Platte 10 x 10 cm); Technik wie bei der Dünnschichtchromatographie. Als Elektrophorese-Puffer wird - wenn nicht anders angegeben - zunächst 8 ml Essigsäure und 20 ml Pyridin ad 100 ml Wasser (pH = 5) verwendet; später 10 ml Essigsäure und 1 ml Pyridin ad 100 ml Wasser (pH = 3,5).

Die Platten werden mit Leitungswasser (ca. 10°C) gekühlt. Bei 260 V/25 mA (große Platten: 500 V/50 mA) läuft die Elektrophorese 30 min (70 min). Alle Peptide wandern zur Kathode.

Dann wird die Platte trockengeföhnt und 30 min bei 120°C getrocknet. Nach dem Auskühlen wird eine Dünnschichtchromatographie in Laufmittel 1 (wie oben beschrieben) durchgeführt und die Platten wiederum markiert.

### 4.8.2 Elution und Identifizierung von Peptiden

Auf nicht mit Pauly-Reagenz angefärbten Platten werden alle interessierenden Peptide ausgekratzt, und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit Laufmittel 1 aus dem Kieselgel eluiert. Z.T. wird auch zusätzlich mit 25%igem Methanol und 80%iger Ameisensäure eluiert. Der Überstand wird nach Abzentrifugieren eingetrocknet, und dann in jeweils 200 µl 6 N HCl (Fa. Merck, Suprapur) im Vakuum bei 110°C über 24 h hydrolysiert.

Die Hydrolysate werden dann im Aminosäureanalysator analysiert. Der Aminosäuregehalt der Proben lag zwischen 0,5 und 4 nmol; die Zuordnung zu einem bestimmten tryptischen Peptid aufgrund der Aminosäurezusammensetzung der Proben gelang jedoch nur in einem Fall.

#### 4.8.3 Gelfiltration der modifizierten Peptide

In einer Säule ( $l = 52$  cm,  $V = 36$  ml) wird das Gel AcA 202 mit Elutionslösung (50 mM  $\text{NH}_3$ ) equilibriert, und rechnerisch 100 nmol lyophilisierte tryptische Peptide modifizierter GDH in 400  $\mu$ l Elutionslösung aufgetragen; die Flußgeschwindigkeit beträgt 1,5 ml/h. Die Extinktion wird bei 206 nm und bei 405 nm gemessen und registriert.

Die Fraktionen Nr. 25 - 28 und Nr. 37 - 43 (sh. Abb. 46) werden vereinigt und eingetrocknet.

#### 4.8.4 Trennung modifizierter tryptischer GDH-Peptide mit HPLC

Die HPLC der Fraktionen 37 - 43, die auf dem Molekularsieb aus dem Gemisch tryptischer Peptide modifizierter GDH abgetrennt wurden, ergab zwei Peaks, die ebenfalls bei 206 nm und 405 nm absorbierten; auch in diesen Präparationen ließ sich jedoch kein Peptid durch seinen Gehalt an Aminosäuren eindeutig identifizieren. Die auf dem Molekularsieb aus dem Gemisch abgetrennten Fraktionen 25 - 28 ergaben in der HPLC keine größeren Peaks.

### **4.9 Aminosäurenanalyse**

Die Aminosäureanalysen wurden auf einem Kontron Liquimat II Analysator durchgeführt. Die Messung erfolgte anhand der Fluoreszenz des Eluates nach Reaktion mit o-Phthalaldehyd.

## 5. Zusammenfassung

Es wurde ein Verfahren entwickelt, das eine stabile Markierung von Histidin-Seitenketten in Proteinen erlaubt.

Mit Hilfe dieses Verfahrens wurden Seitenketten der sn-Glycerin-3-phosphatdehydrogenase modifiziert. Es wurde versucht, die Lokalisation der am Aktivitätszentrum des Enzyms vermutlich beteiligten Histidinseitenketten (2,40) zu bestimmen.

Unter den verschiedenen bekannten Markierungsverfahren wurde die Kupplung mit Diazoniumsalzen nach Pauly (44) wegen ihrer eindeutigen Farbreaktion und der relativ einfachen Durchführung ausgewählt.

Die entstehenden Farbstoffe sind als uneinheitlich und nur für kurze Zeit beständig bekannt (16,20,27,44).

In dieser Arbeit wird eine Modifizierung des von Pauly angegebenen Verfahrens (44) beschrieben, das bei Kupplung von p-Nitrodiazobenzol mit N-Acetylhistidin ein Farbstoffgemisch von befriedigender Stabilität über mehrere Tage und von reproduzierbarer Zusammensetzung liefert.

Die Auftrennung der entstehenden Produkte muß späteren Versuchen vorbehalten bleiben, da das vorrangige Ziel dieser Arbeit die Modifizierung der am Aktivitätszentrum der GDH beteiligten Aminosäuren war.

Die Enzymaktivität der GDH konnte durch Inkubation mit p-Nitrodiazobenzol stöchiometrisch inhibiert werden; es entstand ein gelber Farbstoff, der an das Protein gebunden war.

Die durchgeführten Versuche haben gezeigt, daß essentielle Seitenketten der GDH mit Diazoniumverbindungen modifizierbar sind. Es erscheint möglich, in weiteren Versuchen das gefärbte Peptid zu isolieren und die Position der modifizierten Aminosäuren zu bestimmen.

Bereits jetzt läßt sich aufgrund der relativen Spezifität der Nachweisreaktion und der Färbung der Peptide vermuten, daß es sich hierbei - wie bereits von verschiedenen Autoren (2,40) postuliert - um eine Histidinseitenkette handelt.

## 6. Literaturverzeichnis

- (1) Allen, G.: Sequencing of Proteins and Peptides. North Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford, 1981, S.53-55.
- (2) Apitz-Castro, R. & Suarez, Z.: Structural Studies on the Active Center of alpha-Glycerophosphate Dehydrogenase. *Biochim.Biophys. Acta*, 198(1970)176-182.
- (3) Bailey, J.L.: Techniques in Protein Chemistry, Amsterdam-London-New York 1962, S.22.
- (4) Banaszak, L.J. & Bradshaw, R.A.: Malate Dehydrogenases. in: The Enzymes (Boyer, P.D. Hrsg.) 3.Aufl. 1975, Bd.XI, S.369-396, Academic Press, New York-San Francisco-London.
- (5) Berghäuser, J., Falderbaum, I. & Woenckhaus, C.: Zuordnung eines essentiellen Histidinrestes der Lactatdehydrogenase zur Substratbindungsstelle. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 352(1971)52-58.
- (6) Beyer, H. & Walter, W.: *Lehrb.d.org.Chemie*, Stuttgart, 19.Aufl.1981, S.543.
- (7) Brändén, C.I., Jörnvall, H., Eklund, H. & Furugren, Bo: Alcohol Dehydrogenases. in: The Enzymes, ebd., S.103-190.
- (8) Bücher, Th. & Klingenberg, M.: Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation. *Angew. Chem.* 70(1958)552-570.
- (9) Buehner, M., Ford, G.C., Moras, D., Olsen, K.W. & Rossmann, M.G.: Three-dimensional Structure of D-Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase. *J.Mol. Biol.* 90(1974)25
- (10) Burian, R.: Über die oxidative und vermeintliche synthetische Bildung von Harnsäure im Rinderleberauszug. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 43(1904/1905)492-531.
- (11) Burkhard, A., Dworsky, A., Jeck, R., Pfeiffer, M., Pundak, S. & Woenckhaus, C.: Diazonium-Derivate des ADP zur Identifizierung essentieller Aminosäuren-Seitenreste im aktiven Zentrum von Dehydrogenasen. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 362(1981)1079-1090.
- (12) Chan, J.K. & Anderson, B.M.: A Novel Diazonium Sulfhydryl Reaction in the Inactivation of Yeast Alcohol Dehydrogenase by Diazotized 3-Aminopyridine Adenine Dinucleotide. *J.Biol.Chem.* 250(1975)67-72.
- (13) Cleland, W.W.: Dithiothreitol, a New Protective Agent for SH Groups. *Biochemistry* 3(1964)480-482
- (14) Cramer, F.: *Papierchromatographie*. Verlag Chemie, Weinheim Bergstraße, 5.Aufl.1962, S.94.
- (15) Dickenson, C.J. & Dickinson, F.M.: The Role of an Essential Histidine Residue of Yeast Alcohol Dehydrogenase. *Europ.J.Biochem.* 52(1975)595-603.

- (16) Edlbacher, S., Baur, H., Staehlin, H.R. & Zeller, A.: Die colorimetrische und enzymatische Bestimmung des Histidins. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 270(1941)158-164.
- (17) Ellman, G.L.: Tissue Sulfhydryl Groups. Arch. Biochem.Biophys. 82(1959)70-77.
- (18) van Eys, J., Judd, J., Ford, J. & Womack, W.B.: On the Chemistry of Rabbit Muscle alpha-Glycerophosphate Dehydrogenase. Biochemistry 3(1964)1755-1763.
- (19) Felix, A.M. & Jimenez, M.H.: Usage of fluorescamine as a spray reagent for thin-layer chromatography. J.Chromat. 89(1974)361-364.
- (20) Frank, H. & Peterson, H.: Ein Verfahren zur Bestimmung der Histidin-Konzentration im Blutplasma. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 303(1956)276-281.
- (21) Gattermann, L. & Wieland, Th.: D.Praxis d.org. Chemikers, Berlin, 43.Aufl.1982, S.600 und S.603.
- (22) Gelewitz, E.W., Riedemann, W.L. & Klotz, I.M.: Some Quantitative Aspects of Diazonium Compounds with Serum Albumin. Arch.Biochem.Biophys. 53(1954)411-424.
- (23) Higgins, H.G. & Fraser, D.: The Reaction of Amino Acids and Proteins With Diazonium Compounds. Austr.J.Sci.Res. 5(1952)736-753.
- (24) Higgins, H.G. & Williams, E.J.: Kinetics of Rapid Reactions Involving Two Pairs of Consecutive Second Order Steps. Austr.J.Chem. 6(1953)195-206.
- (25) Horinishi, H., Hachimori, Y., Kurihara, K. & Shibata, K.: States of Amino Acid Residues in Proteins: III. Histidine Residues in Insulin, Lysozyme, Albumine and Proteinases as Determined with a New Reagent of Diazo-1-H-tetrazole. Biochim.Biophys.Acta 86(1964)477-489.
- (26) Howard, A.N. & Wild, F.: The Reactions of Diazonium Compounds with Amino Acids and Proteins. Biochem.J. 65(1957)651-659.
- (28) Jeckel, D. & Zautke, V.: Der diazotierte Sulfanilsäurerest als Reportergruppe in der Azolactat-Dehydrogenase. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 354(1973)209.
- (27) Kapeller-Adler, R.: Über eine neue Methode zur quantitativen Histidinbestimmung und über deren Anwendbarkeit zur Untersuchung von biologischen Flüssigkeiten, insbesondere von Gravidenharnen. Biochem.Z. 264(1933)131-141.
- (28) Kasper, Ch.B.: Fragmentation of Proteins for Sequence Studies and Separation of Peptide Mixtures. in: Needleman, S.B. (Hrsg.): Protein Sequence Determination, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1970, p.137-184.

- (29) Keil, B.: Enzymic Cleavage of Proteins. in: Elzinga, M. (Hrsg.): Methods in Protein Sequence Analysis, Humana Press, Clifton, New Jersey, 1982, S.291-304.
- (30) Klingenberg, M.: Localization of the Glycerol-phosphate Dehydrogenase in the outer Phase of the Mitochondrial Membrane. *Europ.J.Biochem.* 13(1970)247-252.
- (31) Kozak, L.P.: (persönliche Mitteilung). Bar Harbour, Maine/USA.
- (32) Leven, M., Pfeleiderer, G., Berghäuser, J. & Woenckhaus, C.: 1-Alkyl-3-bromacetyl-pyridinium-bromide als Hemmstoffe der Lactat-Dehydrogenase aus Schweineherz. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 350(1969)1647-1652.
- (33) Löffler, G., Petrides, P.E., Weiss, L. & Harper, H.A.: Physiologische Chemie. 2. Aufl. 1979, S. 379 und S. 791, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York.
- (34) Löffler, G. et al.: ebd., S.286.
- (35) MacPherson, H.T.: 6. Modified Procedures for the Colorimetric Estimation of Arginin and Histidine. *Biochem.J.* 36(1942)59-63.
- (36) Millar, D.B.S. & Schwert, G.W.: Lactic Dehydrogenase: IX. Effect of Photooxidation upon Activity and Complex Formation. *J.Biol.Chem.* 238(1963)3249-3255.
- (37) Moras, D., Olsen, K.W., Sabesan, M.N., Buehner, M., Ford, G.C. & Rossmann, M.G.: Studies of Asymmetry in the Three-dimensional Structure of Lobster D-Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase. *J.Biol.Chem.* 250(1975)9137-9162.
- (38) Newman, P.M. & Turnbull, J.H.: A New Colorimetric Method for the Estimation of Histidine and Histamine. *Biochem.J.* 74(1960)379-382.
- (39) Otto, J., Raggi, A., Machleidt, W. & Bücher, Th.: Isolierung und Kristallisation der Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase aus Kaninchenleber. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem.* 353(1972)332-344.
- (40) Otto, J., Machleidt, I., Machleidt, W., Rückl, G. & Wachter, E.: The Covalent Structure of Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 358(1977)927-929.
- (41) Otto, J.: alpha-Glycerophosphatdehydrogenase aus Kaninchenmuskel - Primärstruktur und vergleichende Beobachtungen zu anderen NAD-abhängigen Dehydrogenasen, (1978) Habilitationsschrift, München, Med. Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität.
- (42) Otto, J., Argos, P., Rossmann, M.G.: Prediction of Secondary Structural Elements in Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase by Comparison with Other Dehydrogenases, *Eur.J.Biochem.* 109(1980)325-330.

- (43) Otto, J.: Nicht publizierte Versuche an diesem Institut.
- (44) Pauly, H.: Über die Konstitution des Histidins. I. Mitteilung. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 42(1904)508-551.
- (45) Pauly, H.: Über die Einwirkung von Diazoniumverbindungen auf Imidazole. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 44(1905)159-161.
- (46) Pauly, H.: Zur Kenntnis der Diazoreaktion des Eiweißes. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chemie 94(1915)284-290.
- (47) Pfeleiderer, G. & Jeckel, D.: Kupplungsreaktion an Lactatdehydrogenase nach reversibler Maskierung der SH-Gruppen. Eur.J.Biochem. 2(1967)171-175.
- (48) Riordan, J.F. & Vallee, B.L.: Diazonium Salts as Specific Reagents and Probes of Protein Conformation. Meth.Enz. 25(1972)521-531.
- (49) Rossman, M.G., Liljas, A., Brändén, C.I. & Banaszak, L.J.: Evolutionary and Structural Relationships among Dehydrogenases. in: The Enzymes, ebd., S.61-102.
- (50) Rossman, M.G.: Structure - Function Relationships of NAD-Dependent Dehydrogenases in: Biological Oxidations, (Hrsg. Sund, H. & Ullrich, V.) Springer-Verlag, Heidelberg-New York-Tokyo 1983, S.33-54.
- (51) Saunders, K.H.: The Aromatic Diazo-Compounds. Arnold, London, 2.Aufl.1949, S.99.
- (52) Siggia, S.: Quantitative Organic Analysis. John Wiley & Sons, New York, 1949, S.82-84.
- (53) Sluyterman, L.A.AE.: The Effect of Oxygen upon the Micro Determination of Histidine with the Aid of the Pauly Reaction. Biochem.Biophys.Acta 38(1960)218-221.
- (54) Sluyterman, L.A.AE.: Photooxidation, Sensitized by Proflavin, of a Number of Protein Constituents. Biochim.Biophys.Acta 60(1962)557-561.
- (55) Smith, R.E. & MacQuarrie, R.: The Role of Cysteine Residues in the Catalytic Activity of Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase. Biochim. Biophys.Acta 567(1979)269-277.
- (56) Sokolovsky, M. & Valee, B.L.: The Reaction of Diazonium-1-H-tetrazole with Proteins. Determination of Tyrosine and Histidine Content. Biochemistry 5(1966)3574-3581.
- (57) Stahl, E. (Hrsg.): Dünnschicht-Chromatographie. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 2.Aufl.1967, S.591.
- (58) Takenaka, A., Suzuki, T., Takenaka, O., Horinishi, H. & Shibata, K.: States of Amino Acid Residues in Proteins: XVIII. A Revised Way of Using Diazonium-1-H-tetrazole for Reactivity Examination of Histidine and Tyrosine Residues. Biochim.Biophys.Acta 194(1969)293-300.

- (59) Telegdi, M. & Keleti, T.: The Role of Sulphydryl Groups in alpha-Glycerophosphate Dehydrogenase (L-Glycerol-3-Phosphate: NAD Oxidoreductase 1.1.1.8) Activity. *Acta Physiol.Acad.Sci.Hung.* 25(1964)181-189.
- (60) Udenfriend, S., Stein, S., Böhlen, P., Dairman, W., Leimgruber, W. & Weigle, M.: Fluorescamine: A Reagent for Assay of Amino Acids, Peptides, Proteins, and Primary Amines in the Picomole Range. *Science* 178(1972)871-872.
- (61) Ullmann's Enzyklopädie d. techn. Chemie, Foerst, W. (Hrsg.), Urban & Schwarzenberg, München, 3.Aufl.1954, Bd.5, S.791.
- (62) Ullmann's Ezyklopädie .., ebd., S.811.
- (63) Weil, L. & Seibles, T.S.: Photooxidation of Crystalline Ribonuclease in the Presence of Methylene Blue. *Arch.Biochem.Biophys.* 54(1955)368-377.
- (64) Woenckhaus, C., Berghäuser, J. & Pfeleiderer, G.: Markierung von Aminosäureresten mit markiertem 3-(2-Brom-acetyl)-pyridin. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 350(1969)473-483.
- (65) Woenckhaus, C., Zoltobrocki, M., Berghäuser, J. & Jeck, R.: Spezifischer Einbau des Coenzym-analogen (3-(3-Bromacetylpyridinio)-propyl)-adenosin-pyrophosphat in die Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe. *Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.* 354(1973)60-66.
- (65) Woenckhaus, C., Jeck, R. & Jörnval, H.: Affinity Labelling of Yeast and Liver Alcohol Dehydrogenases with the NAD Analogue 4-(3-Bromacetylpyridinio)butyldiphosphoadenosine. *Europ.J.Biochem.* 93(1979)65-69.
- (66) Zebe, E. Delbrück, A. & Bücher, Th.: Über den Glycerin-1-P-Cyclus im Flugmuskel von *Locusta migratoria*. *Biochem.Z.* 331(1959)254-272.
- (67) Zollinger, H.: Chemie der Azofarbstoffe, Birkhäuser Verlag Stuttgart/Basel 1958, S. 135 u. S. 171.
- (68) Zollinger, H.: Stickstoff als Abgangsgruppe: Dediazonierungen aromatischer Diazonium-Ionen. *Angew.Chem.* 90(1978)151-160.
- (69) Zucker, A. & Otto, J.: Unveröffentlichte Arbeiten an diesem Institut.



## 7. Lebenslauf

Am 1.7.1958 wurde ich als Sohn des Dipl.Phys. Friedrich und der Rechtspflegerin Christiane Hofmann in München geboren.

Nach vier Jahren Volksschule besuchte ich das neu-sprachliche-humanistische Gymnasium in Icking, wo ich am 21.6.1977 die Reifeprüfung ablegte.

Im November des gleichen Jahres begann ich mein Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Während des Studiums hörte ich auch einige Informatikvorlesungen an der Technischen Universität und nahm an Datenverarbeitungslehrgängen der Fa. Siemens teil.

Am 2.5.1985 legte ich den dritten Teil der Ärztlichen Prüfung in München ab und erhielt am 20.5.1985 meine Approbation.

Vom April 1983 bis zum März 1984 unterbrach ich mein Studium, um mich ganz den Versuchen zu meiner Promotionsarbeit über das Aktivitätszentrum der Glycerin-3-phosphatdehydrogenase am Institut für Physiologische Chemie der Universität München zu widmen, die ich im Februar 1982 begonnen hatte. Nach dem III. Staatsexamen führte ich die Arbeiten bis zum Beginn meiner Tätigkeit an der Augenklinik fort.

Von November 1985 bis Februar 1987 habe ich an der Augenklinik der Universität als Arzt meinen Zivildienst geleistet. Aus prinzipiellen Gründen wurde ich nicht in ein reguläres Assistentenverhältnis übernommen, konnte jedoch im April und Mai 1987 nochmals befristet als Assistent an der Klinik arbeiten. Im Anschluß daran habe ich in mehreren Augenarztpraxen in München und Augsburg Vertretungen übernommen.

Ich bin ledig und wohne seit fünf Jahren wieder in München, seit November 1987 in der Rothmundstr. 5/III.



## Anhang

"Der Zettel-Student im Finale"

(aus "Die Zeit", Nr. 47, 15. Nov. 1985, von A. Dross)

Examensnöte? Das muß doch nicht sein. Ein kleiner Leitfaden soll helfen, aus ratlosen Studenten mutige Diplomanden zu machen.

Beginnen wir mit einigen Tips für die Vorbereitung der Abschlußarbeit: Suchen Sie sich keinen allzu jungen Professor, der sich selbst noch profilieren muß, denn das macht nur mehr Arbeit; aber auch keinen alten Hasen, bei dem Sie schon Jahre für das Studium seiner gesammelten Werke brauchen.

Daß Sie jedes schriftliche Wort Ihres Professors lesen, ist selbtsverständlich. Besonderer Wert sollte auf jene Zitate gelegt werden, in denen er sich selbst als Sekundärliteratur heranzieht, das kommt häufig vor. Und jeder Laut, den er fortan von sich gibt, will notiert sein. Schließlich haben Sie gerade dieses Thema und diesen Betreuer gewählt, weil Sie seiner Meinung sind. Zum Ablauf: Bewährt hat sich die Einteilung in zwei Drittel schlechtes Gewissen und ein Drittel Panik, wobei unbedingt auf die Einhaltung dieser Reihenfolge zu achten ist.

Wenn Sie dann Tisch, Bett und Fußboden Ihrer Studierstube mit seinen Werken und denen seiner Lieblingsautoren dekoriert sowie mindestens einen Karteikasten voller Zitate daraus gesammelt haben, können Sie getrost und unverzagt mit dem Zusammenschreiben beginnen, denn die Hauptarbeit ist bereits getan.

Für die Bewertung wissenschaftlicher Arbeiten gilt weniger der Inhalt als das physikalische Gewicht als ausschlaggebender Maßstab. Also: Nicht kleckern, sondern klotzen. Hinein mit allem, was zu diesem Thema schon

einmal gesagt worden ist! Beleuchten Sie jeden noch so nebensächlichen Gedanken von allen nur erdenklichen Seiten. Wiederholen Sie in jedem neuen Kapitel sämtliche Aussagen der vorhergehenden. Und vor allem: Die Masse macht's.

Jeder Ihrer Gedanken verdient es, einen eigenen Gliederungspunkt zu besetzen. Fünf Seiten Gliederung für 50 Seiten Text ist ein gutes Verhältnis. Wenn Sie beim Unterpunkt I.I.a)bb)ccc)dddd)eeee) angelangt sind, haben Sie schon recht gute Arbeit geleistet, eine Arbeit zudem, die sorgfältige Recherchen zumindest vermuten läßt.

Jetzt dürfen Sie auch Ihren Karteikasten hervorholen und Ihre gesammelten Zitate nach einem bestimmten, von Ihnen selbst zu erwählenden Schema in die Arbeit einordnen. Sie können sich nach dem Alphabet richten und hierbei die Anfangsbuchstaben der Vornamen Ihrer Autoren (Nachnamen wären zu auffällig) nehmen, oder aber Sie wählen je ein Zitat für jeden zweiten Absatz.

Sie sollten allerdings ein wenig Sorge tragen, daß einige verbindende Worte zwischen den Zitaten stehen. Guter Stil indes ist reine Zeitverschwendung. Sätze wie "Diese Voraussetzung setzt voraus, daß..." sind durchaus auf üblichem Niveau.

Aus den Zitaten lassen sich zumeist auch prächtig lange Fußnoten ableiten. Hierbei bieten sich abweichende Meinungen möglichst unbekannter Autoren an oder die Abschrift längerer Passagen aus Nachschlagewerken als Erläuterung eines bestimmten Stichwortes oder Sachverhalts.

Und immer mal wieder ein paar locker eingestreute und geschickt plazierte Fremdwörter; hübsche lateinische Ausdrücke, die sich problemlos sowie ohne zufällige Sinnentstellung der deutschen Worte in nahezu jedem Kontext unterbringen lassen. Das hat überdies den Vorzug, sich beim Lehrkörper außerordentlicher Beliebtheit

zu erfreuen, wie zum Beispiel "a priori", "per se", "ex ante" etc.: Das paßt immer und hebt enorm.

Und nicht zuletzt die Ressourcen - sie dürfen in keiner Arbeit fehlen. Das ist auch nicht weiter schwierig, denn jeder Fachbereich baut auf seinen eigenen Ressourcen auf. Freilich: Einerseits werden sie immer knapper (z.B. die Bodenschätze in der Geologie), andererseits immer ergiebiger (z.B. die Pfründe der Menschenseelen in der Psychologie). Ziehen Sie aus Ihren Ressourcen einfach ein paar willige Koeffizienten, lassen Sie diese munter miteinander korrelieren, und siehe da: Irgend etwas Signifikantes kommt schon dabei heraus. Und aus jeder Ihrer Kurven läßt sich - mindestens - eine Tabelle basteln.

Neben den Fremdwörtern hat sich auch die eine oder andere deutsche Redewendung so bewährt, daß sie heute in jeder Arbeit zu finden ist. Dazu gehört das den Eindruck höflicher Bescheidenheit erweckende "ohne Anspruch auf Vollständigkeit", das den Abbruch eines schwierigen Gedankenganges oder einer komplizierten Stoffsammlung an jeder x-beliebigen Stelle erlaubt. Um etwaiger Mißbilligung ständiger Wiederholungen vorzubeugen, empfiehlt sich deren Einleitung mit "Wie schon im vorhergehenden Kapitel erwähnt..." oder "Wie bereits bei der Diskussion von X angedeutet...".

Die von Ihnen betriebene Wissenschaft ist eine Sache, Ihre Person eine völlig andere. Sie selbst als Mensch mit persönlicher Meinung sollten sich da heraushalten. Deshalb sprechen Sie von sich nur noch in der dritten Person: "Der Verfasser ist zu der Ansicht gelangt..." oder "Der Untersucher hält das beschriebene Verfahren für...".

Eigene Wortschöpfungen wirken äußerst schmückend. Außerdem erwecken Sie mit einem solchen Ausdruck schon den Anschein, gar einen neuen Gedankengang selbständig

entwickelt zu haben. Wie gefällt Ihnen "Versozialwissenschaftlichungsprozeßabschnitte"?

Wenn Sie die geplante Anzahl von Seiten engzeilig und randlos um das Dreifache überschritten haben, können Sie guten Gewissens zum Schlußwort kommen. Hierbei ist zu beachten, daß alle angeschnittenen Themenbereiche dringend der weiteren Bearbeitung und Diskussion bedürfen. So beginnen Sie bereits in Ihrer Diplomarbeit den Kampf um eine Planstelle für Ihre anschließende Promotion.

Im Anschluß an die Bibliographie muß nur noch ein Anhang her. Hierfür kopieren Sie aus jedem zweiten Buch Ihrer Literaturangaben jede dritte oder vierte Tabelle und streuen aktuelle Leitartikel verschiedener Tageszeitungen ein; auf den Gesamtzusammenhang kommt es an, wenn Sie nicht als Fachidiot dastehen wollen. Glauben Sie ja nicht, daß zum Beispiel die Hungerkatastrophe in Äthiopien nichts mit der bundesdeutschen Mittelstandsneurose zu tun hätte.

Wenn Sie das Werk tippen lassen: Es erhöht den gewichtigen Eindruck vom Wissenschaftler, wenn Sie dies in der allerletzten Minute tun und die betreffende Dame - Tippse - durch Feierabende und Wochenenden hetzen. Ohne Aufpreis natürlich.

Überlassen Sie so Profanes wie Zeichensetzung und Rechtschreibung ruhig ihr. Diese Dinge gehören nicht in Ihr Fach. Scheuen Sie sich auch nicht, ein chaotisches handschriftliches Manuskript abzuliefern mit grünen, blauen und roten Korrekturen der ersten schwarzen Verbesserungen. Das sieht nicht nur hübsch aus, sondern verhindert, daß Ihre Schreibkraft bereits über der dritten Seite in tiefen Schlaf versinkt.



